

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202192374** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.04.24

(22) Дата подачи заявки
2020.03.03

(51) Int. Cl. *C12N 15/62* (2006.01)
A61K 31/675 (2006.01)
A61K 31/7076 (2006.01)
A61K 35/12 (2015.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07F 9/6584 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 14/74 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01)
C12N 15/867 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
C12N 5/10 (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)

(54) Т-КЛЕТОЧНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/813,651

(32) 2019.03.04

(33) US

(86) PCT/IB2020/051813

(87) WO 2020/178744 2020.09.10

(71) Заявитель:

**ЮНИВЕРСИТИ ХЕЛС НЕТУОРК
(CA)**

(72) Изобретатель:

**Хирано Наото, Мурата Кенджи, Сасо
Кайоко (CA)**

(74) Представитель:

**Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Парамонова К.В.,
Джермакян Р.В., Христофоров А.А.,
Угрюмов В.М., Костюшенкова М.Ю.
(RU)**

(57) Изобретение относится к рекомбинантным Т-клеточным рецепторам, способным связывать эпитоп gp100, и к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим их. В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты дополнительно содержат вторую нуклеотидную последовательность, причем вторая нуклеотидная последовательность или полипептид, кодируемый второй нуклеотидной последовательностью, ингибирует экспрессию эндогенного TCR. Другие аспекты изобретения относятся к векторам, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, и к клеткам, содержащим рекомбинантный TCR, молекулу нуклеиновой кислоты или вектор. Еще другие аспекты изобретения относятся к способам их применения. В некоторых вариантах осуществления способы включают лечение рака у нуждающегося в этом субъекта.

A1

202192374

202192374

A1

Т-КЛЕТОЧНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] В данной заявке РСТ испрашивается приоритет по предварительной заявки США № 62/813 651, поданной 4 марта 2019 г., которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ, ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ ЧЕРЕЗ EFS-WEB

[0002] Содержимое представленного в электронном виде перечня последовательностей (имя: 4285_007PC01_Seqlisting_ST25.txt, размер: 18388 байта; и дата создания: 3 марта 2020 г.) полностью включено в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] В настоящем раскрытии предложены рекомбинантные Т-клеточные рецепторы («TCR»), которые специфически связывают человеческий gp100, и их применения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Иммуноterapia стала критически важным инструментом в борьбе с различными заболеваниями, включая рак. Т-клеточная терапия занимает ведущее место в развитии иммунотерапии, а адоптивный перенос противоопухолевых Т-клеток, как было показано, вызывает клинические ответы у пациентов с раком. Хотя многие Т-клеточные терапии нацелены на мутировавшие опухолевые антигены, подавляющее большинство неоантигенов не являются общими и уникальны для каждого пациента.

[0005] Потенциальные немутировавшие антигены превосходят мутировавшие антигены на несколько порядков. Раскрытие эпитопов Т-клеток, полученных из общих антигенов, может способствовать активной разработке эффективных и безопасных адоптивных Т-клеточных терапий, которые будут легко доступны для большей когорты пациентов с раком. Однако огромное количество немутированных антигенов и высокий полиморфизм генов HLA могли препятствовать всестороннему анализу специфичности противоопухолевых Т-клеточных ответов на немутированные антигены.

[0006] В данном раскрытии предложены новые эпитопы для немутированного антигена gp100 и TCR, способные специфически связывать эти эпитопы. Эти новые эпитопы связаны с определенными аллелями HLA. Применение этих опухолерективных

HLA-ограниченных gp100 TCR расширяет возможности применения анти-gp100 TCR генной терапии, в частности, в иммуноонкологии.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] Определенные аспекты данного раскрытия относятся к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей (i) первую нуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR) или его антигенсвязывающую часть, которая специфически связывает человеческий gp100 («анти-gp100 TCR»); и (ii) вторую нуклеотидную последовательность, причем вторая нуклеотидная последовательность или полипептид, кодируемый второй нуклеотидной последовательностью, ингибирует экспрессию эндогенного TCR, причем анти-gp100 TCR конкурирует за связывание с человеческим gp100 с эталонным TCR, который содержит альфа-цепь и бета-цепь, и причем альфа-цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, а бета-цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

[0008] Определенные аспекты данного раскрытия относятся к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей (i) первую нуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR) или его антигенсвязывающую часть, которая специфически связывает человеческий gp100 («анти-gp100 TCR»); и (ii) вторую нуклеотидную последовательность, причем вторая нуклеотидная последовательность или полипептид, кодируемый второй нуклеотидной последовательностью, ингибирует экспрессию эндогенного TCR, причем анти-gp100 TCR связывает тот же эпитоп или перекрывающийся эпитоп человеческого gp100, что и эталонный TCR, который содержит альфа-цепь и бета-цепь, причем альфа-цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, а бета-цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

[0009] В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR связывается с эпитопом gp100, состоящим из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления эпитоп образует комплекс с молекулой HLA класса I.

[0010] В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты по п. 4, причем молекула HLA класса I представляет собой аллель HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F или HLA-G. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты по п. 4, причем молекула HLA класса I представляет собой аллель HLA-A*24. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 4-

6, причем молекула HLA класса I выбрана из аллеля HLA-A*24:01, аллеля HLA-A*24:02 и аллеля HLA-A*24:03. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 4-7, причем молекула HLA класса I представляет собой аллель HLA-A*24:01.

[0011] В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR содержит альфа-цепь и бета-цепь, причем альфа-цепь содержит переменную область, содержащую CDR1 альфа-цепи, CDR2 альфа-цепи и CDR3 альфа-цепи; а бета-цепь содержит переменную область, содержащую CDR1 бета-цепи, CDR2 бета-цепи и CDR3 бета-цепи; причем CDR3 альфа-цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления CDR3 бета-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10.

[0012] В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR содержит альфа-цепь и бета-цепь, причем альфа-цепь содержит переменную область, содержащую CDR1 альфа-цепи, CDR2 альфа-цепи и CDR3 альфа-цепи; а бета-цепь содержит переменную область, содержащую CDR1 бета-цепи, CDR2 бета-цепи и CDR3 бета-цепи; причем CDR3 бета-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления CDR3 альфа-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7.

[0013] В некоторых вариантах осуществления CDR1 альфа-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления CDR1 бета-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления CDR2 альфа-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления CDR2 бета-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9.

[0014] В некоторых вариантах осуществления переменный домен альфа-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность переменного домена, присутствующего в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления переменный домен бета-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность переменного домена, присутствующего в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2.

[0015] В некоторых вариантах осуществления альфа-цепь анти-gp100 TCR дополнительно содержит константную область, причем константная область отличается от

эндогенной константной области альфа-цепи. В некоторых вариантах осуществления альфа-цепь анти-gp100 TCR дополнительно содержит константную область, причем константная область бета-цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности константной области, присутствующей в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления константная область альфа-цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5 аминокислотных замен относительно константной области, присутствующей в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления бета-цепь анти-gp100 TCR дополнительно содержит константную область, причем константная область отличается от эндогенных константных областей бета-цепи.

[0016] В некоторых вариантах осуществления бета-цепь анти-gp100 TCR дополнительно содержит константную область, причем константная область бета-цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности константной области, присутствующей в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления константная область бета-цепи содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5 аминокислотных замен относительно константной области, присутствующей в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления альфа-цепь анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1.

[0017] В некоторых вариантах осуществления бета-цепь анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления вторая нуклеотидная последовательность представляет собой одну или более мРНК, которые снижают экспрессию эндогенных TCR.

[0018] В некоторых вариантах осуществления одна или более мРНК являются комплементарными целевой последовательности в нуклеотидной последовательности, кодирующей константную область эндогенных TCR. В некоторых вариантах

осуществления одна или более мРНК содержат аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 53-56.

[0019] В некоторых вариантах осуществления вторая нуклеотидная последовательность кодирует Cas9.

[0020] В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR содержит константную область альфа-цепи, константную область бета-цепи или обе; и причем константная область альфа-цепи, константная область бета-цепи или обе содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5 замен в целевой последовательности относительно соответствующей аминокислотной последовательности эндогенного TCR.

[0021] Определенные аспекты настоящего раскрытия относятся к вектору, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты, раскрытую в данном документе. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вирусный вектор, вектор млекопитающих или бактериальный вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой ретровирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор выбран из группы, состоящей из аденовирусного вектора, лентивируса, вектора вируса Сендай, бакуловирусного вектора, вектора вируса Эпштейна — Барра, паповавирусного вектора, вектора вируса осповакцины, вектора вируса простого герпеса, гибридного вектора и вектора аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой лентивирус.

[0022] Определенные аспекты настоящего раскрытия относятся к Т-клеточному рецептору (TCR) или его антигенсвязывающей части, содержащей переменный домен альфа-цепи раскрытого в данном документе анти-gp100 TCR и переменный домен бета-цепи раскрытого в данном документе анти-gp100 TCR. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR) или его антигенсвязывающая часть, которая специфически связывает человеческий gp100 («анти-gp100 TCR»), который конкурирует с эталонным TCR за связывание с человеческим gp100; причем эталонный TCR содержит альфа-цепь и бета-цепь, и причем альфа-цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, а бета-цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2; и причем анти-gp100 TCR содержит альфа-цепь и бета-цепь, причем альфа-цепь содержит константную область, и причем бета-цепь содержит константную область; причем (i) константная область альфа-цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4

или по меньшей мере 5 аминокислотных замен относительно константной области, присутствующей в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1 или (ii) константная область бета-цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5 аминокислотных замен относительно константной области, присутствующей в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2.

[0023] Определенные аспекты настоящего раскрытия относятся к рекомбинантному Т-клеточному рецептору (TCR) или его антигенсвязывающая часть, которая специфически связывает человеческий gp100 («анти-gp100 TCR»), который связывает тот же эпитоп или перекрывающийся эпитоп человеческого gp100, что и эталонный TCR; причем эталонный TCR содержит альфа-цепь и бета-цепь, и причем альфа-цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, а бета-цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2; и причем анти-gp100 TCR содержит альфа-цепь и бета-цепь, причем альфа-цепь содержит константную область, и причем бета-цепь содержит константную область; причем (i) константная область альфа-цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5 аминокислотных замен относительно константной области, присутствующей в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1 или (ii) константная область бета-цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5 аминокислотных замен относительно константной области, присутствующей в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR связывается с эпитопом gp100, состоящим из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 13.

[0024] В некоторых вариантах осуществления эпитоп образует комплекс с молекулой HLA класса I. В некоторых вариантах осуществления молекула HLA класса I представляет собой аллель HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F или HLA-G. В некоторых вариантах осуществления, анти-gp100 TCR по пп. 41 или 42, в котором молекула HLA класса I представляет собой аллель HLA-A*24. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR по любому из пп. 41-43, в котором молекула HLA класса I выбрана из аллеля HLA-A*24:01, аллеля HLA-A*24:02 и аллеля HLA-A*24:03. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR по любому из пп. 41-44, в котором молекула HLA класса I представляет собой аллель HLA-A*24:02.

[0025] В некоторых вариантах осуществления альфа-цепь анти-gp100 TCR содержит

вариабельный домен, содержащий CDR1 альфа-цепи, CDR2 альфа-цепи и CDR3 альфа-цепи; и причем бета-цепь анти-gp100 TCR содержит вариабельный домен, содержащий CDR1 бета-цепи, CDR2 бета-цепи и CDR3 бета-цепи; причем CDR3 альфа-цепи анти-gp100 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления CDR3 бета-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10.

[0026] В некоторых вариантах осуществления альфа-цепь анти-gp100 TCR содержит вариабельный домен, содержащий CDR1 альфа-цепи, CDR2 альфа-цепи и CDR3 альфа-цепи; и бета-цепь анти-gp100 TCR содержит вариабельный домен, содержащий CDR1 бета-цепи, CDR2 бета-цепи и CDR3 бета-цепи; причем CDR3 бета-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления CDR3 альфа-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7.

[0027] В некоторых вариантах осуществления CDR1 альфа-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления CDR1 бета-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления CDR2 альфа-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления CDR2 бета-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9.

[0028] В некоторых вариантах осуществления вариабельный домен альфа-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность вариабельного домена, присутствующего в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления вариабельный домен бета-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность вариабельного домена, присутствующего в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2.

[0029] В некоторых вариантах осуществления константная область альфа-цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности с аминокислотной последовательностью константной области, присутствующей в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1.

[0030] В некоторых вариантах осуществления константная область бета-цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 85%, по

меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности с аминокислотной последовательностью константной области, присутствующей в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2.

[0031] В некоторых вариантах осуществления альфа-цепь анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления бета-цепь анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

[0032] Определенные аспекты настоящего раскрытия относятся к биспецифическому TCR, содержащему первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен, причем первый антигенсвязывающий домен содержит TCR или его антигенсвязывающую часть, раскрытую в данном документе, или TCR или его антигенсвязывающую часть, раскрытую в данном документе. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен содержит одноцепочечный переменный фрагмент («scFv»). В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен специфически связывается с белком, экспрессированным на поверхности Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен специфически связывается с CD3. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен содержит scFv. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен связаны или ассоциированы ковалентной связью. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен связаны пептидной связью.

[0033] Определенные аспекты настоящего раскрытия относятся к клетке, включающей молекулу нуклеиновой кислоты, раскрытую в данном документе, вектор, раскрытый в данном документе, TCR, раскрытый в данном документе, рекомбинантный TCR, раскрытый в данном документе, или биспецифический TCR, раскрытый в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетка дополнительно экспрессирует CD3. В некоторых вариантах осуществления клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, естественной киллерной (NK) клетки, естественной киллерной Т-клетки (NKT) или клетки ILC.

[0034] Определенные аспекты настоящего раскрытия относятся к способу лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту клетки, раскрытой в данном документе. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака костей, рака поджелудочной железы, рака кожи, рака головы

или шеи, рака матки, рака яичников, рака прямой кишки, рака анальной области, рака желудка, рака яичек, рака матки, карциномы фаллопиевых труб, карциномы эндометрия, карциномы шейки матки, карциномы влагалища, карцинома вульвы, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы (НХЛ), первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомы (ПМВКЛ), диффузной В-крупноклеточной лимфомы (ДВККЛ), фолликулярной лимфомы (ФЛ), трансформированной фолликулярной лимфомы, лимфомы маргинальной зоны селезенки (ЛМЗС), рака пищевода, рака тонкой кишки, рака эндокринной системы, рака щитовидной железы, рака паращитовидной железы, рака надпочечников, саркомы мягких тканей, рака уретры, рака полового члена, хронического или острого лейкоза, острого миелоидного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) (включая не Т-клеточный ОЛЛ), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), солидных опухолей детского возраста, лимфоцитарной лимфомы, рака мочевого пузыря, рака почки или мочеточника, карцинома почечной лоханки, новообразования центральной нервной системы (ЦНС), первичной лимфомы ЦНС, опухолевого ангиогенеза, опухоли оси позвоночника, глиомы ствола головного мозга, аденомы гипофиза, саркомы Капоши, эпидермоидного рака, плоскоклеточного рака, Т-клеточной лимфомы, виды рака, индуцированные окружающей средой, включая рак, индуцированный асбестом, другие В-клеточные злокачественные опухоли, а также комбинации указанных видов рака.

[0035] В некоторых вариантах осуществления рак является рецидивирующим или рефрактерным. В некоторых вариантах осуществления рак является местнораспространенным. В некоторых вариантах осуществления рак является распространенным. В некоторых вариантах осуществления рак является метастатическим.

[0036] В некоторых вариантах осуществления клетки получены от субъекта. В некоторых вариантах осуществления клетки получают от донора, отличного от субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъект подвергается предварительной подготовке перед введением клеток. В некоторых вариантах осуществления предварительное кондиционирование включает введение субъекту химиотерапевтического препарата, цитокина, белка, малой молекулы или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления предварительное кондиционирование включает введение субъекту интерлейкина. В некоторых вариантах осуществления предварительное кондиционирование включает введение IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21 или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления предварительное кондиционирование включает введение прекондиционирующего средства, выбранного из группы, состоящей из циклофосфида, флударабина, витамина С, ингибитора АКТ, ATRA, рапамицина или

любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления предварительная подготовка включает в себя введение циклофосфида, флударабина или обоих препаратов.

[0037] Определенные аспекты настоящего раскрытия относятся к способу конструирования антиген-нацеливающей клетки, включающему трансдукцию клетки, полученной от субъекта, нуждающегося в Т-клеточной терапии, нуклеиновой кислотой, раскрытой в данном документе, или вектором, раскрытым в данном документе. В некоторых вариантах осуществления антиген-нацеливающая клетка дополнительно экспрессирует CD3. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой Т-клетку или естественную киллерную (NK) клетку.

[0038] Определенные аспекты данного раскрытия относятся к молекуле HLA класса I, объединенной в комплекс с пептидом, причем молекула HLA класса I содержит домен $\alpha 1$, домен $\alpha 2$, домен $\alpha 3$ и домен $\beta 2m$, а пептид состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14.

[0039] В некоторых вариантах осуществления молекула HLA класса I представляет собой HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F или HLA-G. В некоторых вариантах осуществления молекула HLA класса I представляет собой HLA-A. В некоторых вариантах осуществления молекула HLA класса I представляет собой аллель HLA-A*24. В некоторых вариантах осуществления молекула HLA класса I выбрана из аллеля HLA-A*24:01, аллеля HLA-A*24:02 и аллеля HLA-A*24:03. В некоторых вариантах осуществления молекула HLA класса I представляет собой аллель HLA-A*24:01. В некоторых вариантах осуществления молекула HLA класса I представляет собой аллель HLA-A*24:02.

[0040] В некоторых вариантах осуществления молекула HLA класса I представляет собой мономер. В некоторых вариантах осуществления молекула HLA класса I представляет собой димер. В некоторых вариантах осуществления молекула HLA класса I представляет собой тример. В некоторых вариантах осуществления молекула HLA класса I представляет собой тетрамер. В некоторых вариантах осуществления молекула HLA класса I представляет собой пентамер.

[0041] Определенные аспекты настоящего раскрытия относятся к антигенпрезентирующей клетке (APC), содержащей молекулу HLA класса I, раскрытую в данном документе. В некоторых вариантах осуществления молекула HLA класса I экспрессируется на поверхности APC.

[0042] Определенные аспекты настоящего раскрытия относятся к способу обогащения целевой популяции Т-клеток, полученных от субъекта-человека, включающему приведение Т-клеток в контакт с молекулой HLA класса I, раскрытой в данном документе, или APC, раскрытой в данном документе, причем после приведения в

контакт обогащенная популяция Т-клеток содержит большее количество Т-клеток, способных связывать молекулу HLA класса I, по сравнению с количеством Т-клеток, способных связывать молекулу HLA класса I до приведения в контакт.

[0043] Определенные аспекты настоящего раскрытия относятся к способу обогащения целевой популяции Т-клеток, полученных от человека, включающему приведение Т-клеток *in vitro* в контакт с пептидом, причем пептид состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 13, причем после приведения в контакт обогащенная популяция Т-клеток содержит большее количество Т-клеток, способных нацеливаться на опухолевую клетку, по сравнению с количеством Т-клеток, способных нацеливаться на опухолевую клетку до приведения в контакт.

[0044] В некоторых вариантах осуществления изобретения Т-клетки, полученные от субъекта-человека, являются инфильтрирующими опухоль лимфоцитами (TIL).

[0045] Определенные аспекты настоящего раскрытия относятся к способу лечения опухоли у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту обогащенной популяции Т-клеток, раскрытых в данном документе.

[0046] Определенные аспекты настоящего раскрытия относятся к способу усиления опосредованного цитотоксическими Т-клетками нацеливания на раковые клетки у субъекта, страдающего раком, включающему введение субъекту пептида, имеющего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13.

[0047] Определенные аспекты настоящего раскрытия относятся к противораковой вакцине, содержащей пептид, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13.

[0048] Некоторые аспекты настоящего раскрытия относятся к способу отбора Т-клеток, способных нацеливаться на опухолевую клетку, включающему приведение популяции выделенных Т-клеток *in vitro* в контакт с пептидом, причем пептид состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0049] На фиг. 1A-1D представлены графические изображения окрашивания мультимерами A*24:02/gp100-intron4 TIL меланомы. TIL стимулировали A*24:02-искусственными APC, в которые вводили пептид gp100-intron4. Показаны данные по окрашиванию мультимером A*24:02/gp100-intron4 (фиг. 1A-1B) или контрольным мультимером A*24:02/HTLV-1 tax₃₀₁₋₃₀₉ (фиг. 1C-1D) перед стимуляцией (день 0; фиг. 1A и

1С) и через 14 дней после стимуляции (день 14; фиг. 1В и 1D). Показан процент мультимер⁺ клеток в CD8⁺ Т-клетках.

[0050] На фиг. 2 представлена гистограмма, иллюстрирующая функциональную оценку A*24:02/gp100-intron4 мультимер-положительных ТИЛ меланомы. Выработка IFN-γ положительными по A*24:02 ТИЛ специфическим для HLA-A*24:02-ограниченного пептида образом. ТИЛ были использованы в качестве иммунореактивных клеток в анализе ELISPOT для определения уровня IFN-γ. Были получены HLA-A*24:02-трансдуцированные Т2-клетки (Т2-A*24:02). Т2- или Т2-A*24:02-клетки, в которые вводили перекрывающиеся пептиды, были использованы в качестве клеток-стимуляторов. Пептид HTLV-1 tax₃₀₁₋₃₀₉ использовали в качестве контроля. Эксперименты проводились в трех повторностях, и столбцы ошибок отображают стандартное отклонение (СО). ***P* < 0,01, ****P* < 0,001.

[0051] На фиг. 3А-3І представлены графические изображения положительного окрашивания клеток Jurkat 76/CD8, трансдуцированных генами A*24:02/gp100-intron4 TCR с когнатным мультимером. Клетки Jurkat 76/CD8, трансдуцированные с помощью A*24:02/gp100-intron4 TCR (фиг. 3В, 3Е и 3Н), окрашивали мультимером A*24:02/gp100-intron4 (фиг. 3В). Мультимер A*24:02/HTLV-1 tax₃₀₁₋₃₀₉ (фиг. 3D, 3Е и 3F), A*24:02/неизмененный мультимер (фиг. 3G, 3Н и 3І), клетки Jurkat 76/CD8, трансдуцированные с помощью A*24:02/MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ TCR (клон МА24; фиг. 3С, 3F и 3І) и нетрансдуцированные (фиг. 3А, 3D и 3G) использовали в качестве контролей. Показан процент мультимер⁺ CD8⁺ Т-клеток.

[0052] На фиг. 4А-4D представлены графические изображения положительного окрашивания первичных Т-клеток человека, трансдуцированных генами A*24:02/gp100-intron4 TCR (фиг. 4В и 4D) с помощью когнатного мультимера. Первичные Т-клетки, трансдуцированные с помощью A*24:02/gp100-intron4 TCR, окрашивали с помощью A*24:02/gp100-intron4 (фиг. 4В) или контрольным мультимером A*24:02/HTLV-1 tax₃₀₁₋₃₀₉ (фиг. 4D). Нетрансдуцированные первичные Т-клетки использовали в качестве отрицательных контролей (фиг. 4А и 4С). Показан процент мультимер⁺ CD8⁺ Т-клеток.

[0053] На фиг. 5 представлена гистограмма, иллюстрирующая, что первичные Т-клетки человека, трансдуцированные генами A*24:02/gp100-intron4 TCR, вступают в сильную реакцию с когнатным пептидом, представленным целевой молекулой класса I. Первичные Т-клетки, трансдуцированные генами A*24:02/gp100-intron4 TCR или нетрансдуцированные первичные Т-клетки (ось x) были использованы в качестве иммунореактивных клеток в анализе ELISPOT для определения уровня IFN-γ. Т2- или Т2-A*24:02-клетки, в которые вводили пептид gp100-intron4 или HTLV-1 tax₃₀₁₋₃₀₉ (контроль),

были использовали в качестве клеток-стимуляторов. Эксперименты проводились в трех повторностях, и столбцы ошибок отображают СО. $**P < 0,01$.

[0054] На фиг. 6А представлено графическое изображение, иллюстрирующее, что первичные Т-клетки, трансдуцированные генами A*24:02/gp100-intron4 TCR, распознают опухолевые клетки. Первичные Т-клетки, трансдуцированные генами A*24:02/gp100-intron4 TCR или нетрансдуцированные первичные Т-клетки были использованы в качестве иммунореактивных клеток в анализе ELISPOT для определения уровня IFN- γ . Клетки Malme-3М, SK-MEL-28 и A375, которые были нетрансдуцированными или трансдуцированными с помощью HLA-A*24:02 и/или gp100-intron4, как указано на фиг. 6В (условные обозначения к фиг. 6А), использовали в качестве клеток-стимуляторов. Эксперименты проводились в трех повторностях, и столбцы ошибок отображают СО. $*P < 0,05$, $**P < 0,01$, $***P < 0,001$.

[0055] На фиг. 7А-7Е представлены графические изображения экспрессии эндогенного гена gp100 или трансдуцированного гена gp100-intron4. Экспрессию эндогенного gp100 полученного из эндогенного или трансдуцированного гена gp100-intron4 в клетках-мишенях анализировали с помощью внутриклеточной проточной цитометрии после окрашивания с помощью mAb к gp100 (незаполненная кривая) и изотипический контроль (заполненная кривая).

[0056] На фиг. 8А-8F представлены графические изображения экспрессии Δ NGFR в клетках-мишенях, трансдуцированных полноразмерным геном HLA-A*24:02, меченным Δ NGFR (фиг. 8В, 8D и 8F). Поверхностную экспрессию Δ NGFR в клетках-мишенях, трансдуцированных полноразмерным геном HLA-A*24:02, меченным Δ NGFR, анализировали методом проточной цитометрии после окрашивания с помощью mAb к NGFR (незаполненная кривая) и изотипического контроля (заполненная кривая). Только Δ NGFR использовали в качестве контроля (фиг. 8А, 8С и 8Е).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0057] Настоящее раскрытие относится к TCR или их антигенсвязывающим частям, которые специфически связываются с эпитопом на gp100, молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим их, и клеткам, содержащим TCR или молекулу нуклеиновой кислоты. Некоторые аспекты настоящего раскрытия относятся к способам лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающим введение субъекту клетки. Другие аспекты настоящего раскрытия относятся к молекулам HLA класса I, объединенным в комплекс с пептидом, содержащим эпитоп gp100.

I. Термины

[0058] Для того, чтобы настоящее раскрытие было более понятным, сначала определены некоторые термины. При использовании в настоящей заявке, если только иное прямо не предусмотрено в данном документе, каждый из следующих терминов имеет значение, указанное ниже. Дополнительные определения приведены по всему тексту заявки.

[0059] Следует отметить, что термины в форме единственного числа включают ссылки на одно или более; например, «нуклеотидная последовательность» означает одну или более нуклеотидных последовательностей. Следовательно, термины в форме единственного числа, а также выражения «один или более» и «по меньшей мере один» могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо.

[0060] Кроме того, в данном контексте «и/или» следует рассматривать как конкретное описание каждого из двух указанных признаков или компонентов с другим или без него. Таким образом, термин «и/или», используемый в такой фразе, как «А и/или В», предназначен для включения «А и В», «А или В»; «А» (отдельно) и «В» (отдельно). Аналогично, термин «и/или», используемый в такой фразе, как «А, В и/или С», предназначен для охвата каждого из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно); и С (отдельно).

[0061] В контексте данного документа термин «около» применяется для обозначения приблизительно, примерно, около или в области. Если около термин «около» применяется в сочетании с числовым диапазоном, то он изменяет этот диапазон, расширяя границы выше и ниже указанных числовых значений. В целом, термин "около" используется в данном документе для изменения числового значения выше и ниже указанного значения с отклонением, например, 10 процентов, вверх или вниз (выше или ниже).

[0062] Следует понимать, что в тех случаях, когда аспекты описаны в данном документе с формулировкой «содержащий», в противном случае также предложены аналогичные аспекты, описанные в терминах «состоящий из» и/или «состоящий в основном из».

[0063] Если не указано иное, все используемые в данном документе технические и научные термины имеют общепринятые значения, понятные специалисту в области техники, к которой относится данное изобретение. Например, Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; и Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press, обеспечивают специалиста общим

словарем многих терминов, используемых в данном описании.

[0064] Единицы, префиксы и символы обозначаются в их общепринятой форме Международной системы единиц измерения (СИ). Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Если не указано иное, нуклеиновые кислоты записываются слева направо в ориентации от 5'- до 3'-конца. Аминокислотные последовательности записываются слева направо в ориентации от amino до карбокси. Заголовки, представленные в данном документе, не являются ограничениями различных аспектов изобретения, которые могут быть осуществлены со ссылкой на спецификацию в целом. Соответственно, термины, определенные ниже, определены в более полном объеме со ссылкой на это описание в целом.

[0065] Термин «введение» относится к физическому введению средства субъекту с использованием любого из различных способов и систем доставки, известных специалистам в данной области техники. Примеры путей введения составов, раскрытых в данном документе, включают внутривенный, внутримышечный, подкожный, внутрибрюшинный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, путем инъекции или инфузии. В контексте данного документа выражение «парентеральное введение» означает режимы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно посредством инъекции, и включают, без ограничения, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрилимфатическую, внутриочаговую, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, интрадермальную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интратермальную инъекцию и инфузию, а также электропорацию *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления состав вводят непарентеральным путем, *например*, перорально. Другие непарентеральные пути включают местный, эпидермальный путь или путь введения через слизистые оболочки, например интраназально, вагинально, ректально, сублингвально или местно. Введение также может быть выполнено, например, один раз, много раз и/или в течение одного или нескольких продолжительных периодов.

[0066] В контексте данного документа термин «Т-клеточный рецептор» (TCR) относится к гетеромерному рецептору клеточной поверхности, способному специфически взаимодействовать с целевым антигеном. В контексте данного документа термин «TCR» включает, но не ограничивается ими, встречающиеся в природе и не встречающиеся в природе TCR; полноразмерные TCR и их антигенсвязывающие части; химерные TCR; конструкции слияния TCR; и синтетические TCR. У человека TCR экспрессируются на поверхности Т-клеток, и они отвечают за распознавание Т-клеток и нацеливание на

антигенпрезентирующие клетки. Антигенпрезентирующие клетки (APC) демонстрируют фрагменты чужеродных белков (антигенов), образующие комплекс с главным комплексом гистосовместимости (МНС; также называемые в данном как объединенные в комплекс с молекулой HLA, *например*, молекулой HLA класса 1). TCR распознает и связывается с комплексом антиген:HLA и рекрутирует CD3 (экспрессируемый Т-клетками), активируя TCR. Активированный TCR инициирует нисходящую передачу сигналов и иммунный ответ, включая разрушение EPC.

[0067] В целом, TCR может содержать две цепи, альфа-цепь и бета-цепь (или, реже, гамма-цепь и дельта-цепь), связанные дисульфидными связями. Каждая цепь содержит переменный домен (переменный домен альфа-цепи и переменный домен бета-цепи) и константную область (константную область альфа-цепи и константную область бета-цепи). Переменный домен расположен дистальнее клеточной мембраны, и переменный домен взаимодействует с антигеном. Константная область расположена проксимальнее клеточной мембраны. TCR может дополнительно содержать трансмембранную область и короткий цитоплазматический концевой сегмент. В контексте данного документа термин «константная область» охватывает трансмембранную область и цитоплазматический концевой сегмент, если он присутствует, а также традиционную «константную область».

[0068] Переменные домены могут быть дополнительно поделены на области гиперпеременности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждый переменный домен альфа-цепи и переменный домен бета-цепи содержат три CDR и четыре FR: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Каждый переменный домен содержит связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Хотя все три CDR на каждой цепи задействованы в связывании антигена, считается, что CDR3 является первичной антигенсвязывающей областью. CDR1 также взаимодействует с антигеном, в то время как считается, что CDR2 в первую очередь распознает комплекс HLA.

[0069] Если прямо не указано, и если контекст не указывает на иное, термин «TCR» также включает антигенсвязывающий фрагмент или антигенсвязывающую часть любого TCR, раскрытого в данном документе, и включает моновалентный и двухвалентный фрагмент или часть, а также одноцепочечный TCR. Термин «TCR» не ограничивается встречающимися в природе TCR, связанными с поверхностью Т-клетки. В контексте данного документа термин «TCR» дополнительно относится к описанному в данном документе TCR, который экспрессируется на поверхности клетки, отличной от Т-клетки (*например*, клетки, которая экспрессируется естественным образом или которая модифицирована для экспрессии CD3, как описано в данном документе), или описанному

в данном документе TCR, который не содержит от клеточной мембраны (*например*, выделенный TCR или растворимый TCR).

[0070] «Антигенсвязывающая молекула», «часть TCR» или «фрагмент TCR» относится к любой части TCR, меньшей по размеру, чем весь TCR. Антигенсвязывающая молекула может включать определяющие антигенную комплементарность области (CDR).

[0071] «Антиген» относится к любой молекуле, *например*, пептиду, которая вызывает иммунный ответ или способна связываться с TCR. В контексте данного документа термин «эпитоп» относится к части полипептида, которая вызывает иммунный ответ или способна связываться с TCR. Иммунный ответ может предполагать или выработку антител, или активацию специфичных иммуно-компетентных клеток, или и то, и другое. Специалисту в данной области техники будет понятно, что любая макромолекула, включая практически все белки или пептиды, может служить в качестве антигена. Антиген и/или эпитоп могут быть эндогенно экспрессированы, *т.е.* экспрессироваться геномной ДНК, или могут быть рекомбинантно экспрессированы. Антиген и/или эпитоп могут быть специфичными для определенной ткани, такой как раковая клетка, или могут быть широко экспрессированы. Кроме того, фрагменты более крупных молекул могут функционировать как антигены. В одном варианте осуществления антигены представляют собой опухолевые антигены. Эпитоп может присутствовать в более длинном полипептиде (*например*, в белке), или эпитоп может присутствовать в виде фрагмента более длинного полипептида. В некоторых вариантах осуществления эпитоп образует комплекс с главным комплексом гистосовместимости (МНС; также называемый в данном как объединенный в комплекс с молекулой HLA, *например*, молекулой HLA класса I).

[0072] «gp100», «гликопротеин 100», «белок меланоцитов PMEL» или «ME20M» в контексте данного документа относятся к опухолевому антигену, экспрессирующемуся, *например*, в меланоме. gp100 представляет собой гидрофобный гликопротеин из 661 аминокислоты с молекулярной массой 70 кДа (номер доступа в GenBank NM_006928). *См., напр.,* Eisenberg et al., *Cell Immunol.* 266(1):98-103 (2010). *In vivo*, gp100 участвует в созревании меланосом от стадии I до стадии II. В контексте данного документа gp100 относится не только к полноразмерной канонической последовательности, но также к ее вариантам и фрагментам. Известные варианты gp100 представлены на сайте www.uniprot.org (UniProtKB – P40967; дата последнего обращения: 1 марта 2019 г.).

Таблица 1. Аминокислотные последовательности gp100

SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность gp100
52	MDLVLRCLLHLAVIGALLAVGATKVP RNQDWLGVS RQLRTKAWN RQ

	LYPEWTEAQRLDCWRGGQVSLKVSNDGPTLIGANASFSIALNFPGSQKV LPDGQVIWVNNTIINGSQVWGGQPVPYQETDDACIFPDGGPCPSGSWSQ KRSFVYVWKTWGQYWQVLGGPVSGLSIGTGRAMLGHTTMEVTVYHRR GSRSYVPLAHSSSAFTITDQVPFSVSVSQLRALDGGNKHFLRNQPLTFAL QLHDPSGYLAEADLSYTWDFGDSSGTLISRALVVTHTYLEPGPVTAQVV LQAAIPLTSCGSSPVPGTDDGHRPTAEAPNTTAGQVPTTEVVGTTPGQAP TAEPSGTTSVQVPTTEVISTAPVQMPTAESTGMTPEKVPVSEVMGTTLAE MSTPEATGMTPAEVSIVVLSGTTAAQVTTTEWVETTARELPIPEPEGPDA SSIMSTESITGSLGPLLDGTATLRLVKRQVPLDCVLYRYGSFSVTLDIVQGI ESAEILQAVPSGEGDAFELTVSCQGGLPKEACMEISSPGCQPPAQRLCQPV LPSPACQLVLHQILKGGSGTYCLNVSLADTNSLAVVSTQLIMPGQEAGLG QVPLIVGILLVLMAVVLASLIYRRRLMKQDFSVPQLPHSSSHWLRLPRIFC SCPIGENSPLLSGQQV
--	--

[0073] В контексте данного документа, термин «HLA» относится к человеческому лейкоцитарному антигену. Гены HLA кодируют белки главного комплекса гистосовместимости (МНС) у людей. Белки МНС экспрессируются на поверхности клеток и задействованы в активации иммунного ответа. Гены HLA класса I кодируют молекулы МНС класса I, которые экспрессируются на поверхности клеток в комплексе с пептидными фрагментами (антигенами) собственных или чужеродных белков. Т-клетки, экспрессирующие TCR и CD3, распознают комплекс антиген:МНС класса I и инициируют иммунный ответ, направленный на нацеливание и уничтожение антигенпрезентирующих клеток, отображающих чужеродные белки.

[0074] В контексте данного документа «молекула HLA класса I» или «молекула HLA класса I» относится к белковому продукту дикого типа или варианту гена HLA класса I, кодирующему молекулу МНС класса I. Соответственно, «молекула HLA класса I» и «молекула МНС класса I» используются в данном документе взаимозаменяемо.

[0075] Молекула МНС класса I включает две белковые цепи: альфа-цепь и цепь $\beta 2$ -микроглобулина ($\beta 2m$). Человеческий $\beta 2m$ кодируется геном B2M. Аминокислотная последовательность $\beta 2m$ представлена в SEQ ID NO: 16 (Таблица 2). Альфа-цепь молекулы МНС класса I кодируется комплексом гена HLA. Комплекс HLA расположен в области бр21.3 на коротком плече хромосомы 6 человека и содержит более 220 генов с различными функциями. Гены HLA являются высоко вариативными, с более чем 20 000 аллелей HLA и родственных аллелей, включая более 15 000 аллелей HLA класса I, известных в данной области техники, кодирующих тысячи белков HLA, включая более 10 000 белков HLA

класса I (см., например, hla.alleles.org, дата последнего посещения: 27 февраля 2019 года). В комплексе HLA имеется по меньшей мере три гена, которые кодируют белок альфа-цепи MHC класса I: HLA-A, HLA-B и HLA-C. Кроме того, HLA-E, HLA-F и HLA-G кодируют белки, которые связаны с молекулой MHC класса I.

Таблица 2. Аминокислотная последовательность человеческого $\beta 2m$

SEQ ID NO:	Последовательность
16	MSRSVALAVLALLSLSGLEAIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVS GFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKDE YACRVNHVTL SQPKIVKWDRDM

[0076] Термин «аутологичный» относится к любому материалу, полученному от того же индивидуума, которому он позже будет повторно введен. Например, терапия аутологичными Т-клетками включает введение субъекту Т-клетки, выделенной из организма того же субъекта. Термин «аллогенный» относится к любому материалу, полученному от одного индивидуума, который затем вводится другому индивидууму того же вида. Например, трансплантация аллогенных Т-клеток включает введение субъекту Т-клетки, полученной от донора, отличного от субъекта.

[0077] «Рак» относится к широкой группе различных заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом аномальных клеток в организме. Нерегулируемое деление и рост клеток приводит к образованию злокачественных опухолей, которые проникают в соседние ткани, а также могут метастазировать в отдаленные части тела через лимфатическую систему или кровотоки. Термин «рак» или «раковая ткань» может включать в себя опухоль. Примеры видов рака, которые можно лечить способами по настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются ими, рак иммунной системы, включая лимфому, лейкоз и другие лейкоцитарные злокачественные образования. В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению могут быть применены для уменьшения размера опухоли, происходящей, например, из рака кости, рака почки, рака предстательной железы, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака легкого, кожной или внутриглазной злокачественной меланомы, рака поджелудочной железы, рака кожи, рака головы или шеи, кожной или внутриглазной злокачественной меланомы, рака матки, карциномы фаллопиевых труб, карциномы эндометрия, карциномы шейки матки, карциномы влагалища, карцинома вульвы, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы (НХЛ), первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомы (ПМБКЛ), диффузной В-крупноклеточной лимфомы

(ДВККЛ), фолликулярной лимфомы (ФЛ), трансформированной фолликулярной лимфомы, лимфомы маргинальной зоны селезенки (ЛМЗС), рака пищевода, рака тонкой кишки, рака эндокринной системы, рака щитовидной железы, рака паращитовидной железы, рака надпочечников, саркомы мягких тканей, рака уретры, рака полового члена, хронического или острого лейкоза, острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), хронического миелоидного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) (включая не Т-клеточный ОЛЛ), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), солидных опухолей детского возраста, лимфоцитарной лимфомы, рака мочевого пузыря, рака почки или мочеточника, карцинома почечной лоханки, новообразования центральной нервной системы (ЦНС), первичной лимфомы ЦНС, опухолевого ангиогенеза, опухоли оси позвоночника, глиомы ствола головного мозга, аденомы гипофиза, саркомы Капоши, эпидермоидного рака, плоскоклеточного рака, Т-клеточной лимфомы, виды рака, индуцированные окружающей средой, включая рак, индуцированный асбестом, другие В-клеточные злокачественные опухоли, а также комбинации указанных видов рака. Конкретный вид рака может отвечать на химиотерапию или лучевую терапию, или рак может быть рефрактерным. Рефрактерный рак относится к раку, который не поддается хирургическому вмешательству, и рак либо изначально не отвечает на химиотерапию или лучевую терапию, либо рак перестает отвечать с течением времени.

[0078] В контексте данного документа термин «противоопухолевый эффект» относится к биологическому эффекту, который может проявляться в виде уменьшения объема опухоли, уменьшения количества опухолевых клеток, снижения пролиферации опухолевых клеток, уменьшения количества метастазов, повышения общей выживаемости или выживаемости без прогрессирования, повышения продолжительности жизни или улучшения различных физиологических симптомов, ассоциированных с опухолью. Противоопухолевый эффект также может относиться к предотвращению возникновения опухоли, *например*, к вакцине.

[0079] Термин «выживаемость без прогрессирования», который может быть сокращен как ВБП, в контексте данного документа относится к промежутку времени от даты начала лечения до даты прогрессирования заболевания в соответствии с пересмотренными критериями ответа IWG для злокачественной лимфомы или до даты смерти по любой причине.

[0080] «Прогрессирование заболевания» или «прогрессирующее заболевание», которое в контексте данного документа может быть сокращено как ПЗ, относится к ухудшению одного или более симптомов, ассоциированных с конкретным заболеванием. Например, прогрессирование заболевания у субъекта, страдающего раком, может включать

увеличение количества или размера одного или более злокачественных поражений, метастазирование опухоли и смерть.

[0081] Термин «продолжительность ответа», который может быть сокращен как ПрО, в контексте данного документа относится к периоду времени между первым объективным ответом субъекта и датой подтвержденного прогрессирования заболевания в соответствии с пересмотренными критериями ответа IWG для злокачественной лимфомы или до датой смерти.

[0082] Термин «общая выживаемость», который может быть сокращен как ОВ, определяется как время от даты проведенного лечения до даты смерти.

[0083] «Цитокин» в контексте данного документа относится к белку, не являющемуся антителом, который высвобождается одной клеткой в ответ на контакт со специфическим антигеном, при этом цитокин взаимодействует со второй клеткой, опосредуя ответ во второй клетке. Цитокин может эндогенно экспрессироваться клеткой или может быть введен субъекту. Цитокины могут высвобождаться иммунными клетками, включая макрофаги, В-клетки, Т-клетки и тучные клетки, для развития иммунного ответа. Цитокины могут вызывать различные ответы в клетке-реципиенте. Цитокины могут включать гомеостатические цитокины, хемокины, провоспалительные цитокины, эффекторы и белки острой фазы. Например, гомеостатические цитокины, включая интерлейкин (IL) 7 и IL-15, способствуют выживанию и пролиферации иммунных клеток, а провоспалительные цитокины могут способствовать развитию воспалительного ответа. Примеры гомеостатических цитокинов включают, но не ограничиваются ими, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-15 и интерферон (IFN) гамма. Примеры провоспалительных цитокинов включают, но не ограничиваются ими, IL-1a, IL-1b, IL-6, IL-13, IL-17a, фактор некроза опухоли (ФНО)-альфа, ФНО-бета, фактор роста фибробластов (FGF) 2, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), растворимую молекулу межклеточной адгезии 1 (sICAM-1), растворимую молекулу сосудистой адгезии 1 (sVCAM-1), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), VEGF-C, VEGF-D и фактор роста плаценты (PLGF). Примеры эффекторов включают, но не ограничиваются ими, гранзим А, гранзим В, растворимый лиганд Fas (sFasL) и перфорин. Примеры белков острой фазы включают, но не ограничиваются ими, С-реактивный белок (СРБ) и сывороточный амилоид А (SAA).

[0084] «Хемокины» представляют собой тип цитокинов, которые опосредуют хемотаксис клеток или направленное движение. Примеры хемокинов включают, но не ограничиваются ими, IL-8, IL-16, эотаксин, эотаксин-3, хемокин, полученный из макрофагов (MDC или CCL22), моноцитарный хемотаксический белок-1 (MCP-1 или

CCL2), MCP-4, макрофагальный воспалительный белок 1 α (MIP-1 α , MIP-1a), MIP-1 β (MIP-1b), гамма-индуцированный белок 10 (IP-10) и регулируемый тимусом и активацией хемокин (TARC или CCL17).

[0085] Другие примеры аналитов и цитокинов по настоящему изобретению включают, но не ограничиваются ими, хемокиновый (мотив C-C) лиганд (CCL) 1, CCL5, моноцит-специфический хемокин 3 (MCP3 или CCL7), хемоаттрактантный белок моноцитов 2 (MCP-2 или CCL8), CCL13, IL-1, IL-3, IL-9, IL-11, IL-12, IL-14, IL-17, IL-20, IL-21, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ), лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), онкостатин М (OSM), CD154, лимфотоксин (LT) бета, лиганд 4-1BB (4-1BBL), лиганд, индуцирующий пролиферацию (APRIL), CD70, CD153, CD178, глюкокортикоид-индуцированный лиганд, связанный с рецептором ФНО (GITRL), член суперсемейства факторов некроза опухоли 14 (TNFSF14), OX40L, лиганд 1, экспрессируемый ФНО- и APOI-связанными лейкоцитами (TALL-1) или ФНО-связанный индуцирующий апоптоз лиганд (TRAIL).

[0086] «Терапевтически эффективное количество», «эффективная доза», «эффективное количество» или «терапевтически эффективная дозировка» лекарственного препарата или терапевтического средства представляет собой любое количество лекарственного препарата, которое при использовании отдельно или в комбинации с другим терапевтическим средством защищает субъект от развития заболевания или способствует регрессии заболевания, о чем свидетельствует уменьшение тяжести симптомов заболевания, увеличение частоты и продолжительности бессимптомных периодов заболевания или предотвращению нарушений функций или инвалидности из-за болезни. Способность терапевтического средства способствовать регрессии заболевания может быть оценена с использованием множества способов, известных квалифицированному практикующему врачу, например, у людей во время клинических испытаний, в системах животных моделей, предсказывающих эффективность применения у людей или путем анализа активности агента в анализах *in vitro*.

[0087] В контексте данного документа термин «лимфоцит» включает естественные киллерные (NK) клетки, Т-клетки или В-клетки. NK-клетки представляют собой тип цитотоксических (токсичных для клеток) лимфоцитов, которые представляют собой основной компонент врожденной иммунной системы. NK-клетки отторгают опухоли и клетки, инфицированные вирусами. Они работают через процесс апоптоза или запрограммированной гибели клеток. Их назвали «естественными киллерами», потому что они не требуют активации для уничтожения клеток. Т-клетки играют важную роль в клеточном иммунитете (без задействования антител). Т-клеточные рецепторы (TCR)

дифференцируют Т-клетки от других типов лимфоцитов. Тимус, специализированный орган иммунной системы, в первую очередь отвечает за созревание Т-клеток. Существует шесть типов Т-клеток, а именно: хелперные Т-клетки (*например*, CD4⁺ клетки), цитотоксические Т-клетки (также известные как ТС, цитотоксический Т-лимфоцит, CTL, клетка Т-киллер, цитолитические Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки или киллерные Т-клетки), Т-клетки памяти ((i), стволовые клетки памяти T_{SCM}, как и наивные клетки, являются CD45RO⁻, CCR7⁺, CD45RA⁺, CD62L⁺ (L-селектин), CD27⁺, CD28⁺ и IL-7Rα⁺, но они также экспрессируют большое количество CD95, IL-2Rβ, CXCR3 и LFA-1, и демонстрируют многочисленные функциональные признаки, характерные для клеток памяти); (ii) центральные клетки памяти T_{CM} экспрессируют L-селектин и CCR7, они секретируют IL-2, но не IFNγ или IL-4, и (iii) эффекторные клетки памяти T_{EM}, хотя не экспрессируют L-селектин или CCR7, но продуцируют эффекторные цитокины, такие как IFNγ и IL-4), регуляторные Т-клетки (Treg, супрессорные Т-клетки или CD4⁺CD25⁺ регуляторные Т-клетки), естественные киллерные Т-клетки (NKT) и гамма-дельта Т-клетки. В-клетки, с другой стороны, играют основную роль в гуморальном иммунитете (с задействованием антител). В-клетка вырабатывает антитела и антигены и выполняет роль антигенпрезентирующих клеток (APC) и превращается в В-клетки памяти после активации путем взаимодействия антигенов. У млекопитающих незрелые В-клетки образуются в костном мозге, откуда и произошло их название.

[0088] Термин «генетически сконструированный» или «сконструированный» относится к способу модификации генома клетки, включая, но не ограничиваясь этим, удаление кодирующей или не кодирующей области или ее части, или вставку кодирующей области или ее части. В некоторых вариантах осуществления модифицируемая клетка представляет собой лимфоцит, *например*, Т-клетку или модифицированную клетку, экспрессирующую CD3, которая может быть получена от пациента или донора. Клетка может быть модифицирована для экспрессии экзогенной конструкции, такой как, *например*, Т-клеточный рецептор (TCR), раскрытый в данном документе, которая включена в геном клетки. В некоторых вариантах осуществления клетка является модифицированной для экспрессии CD3.

[0089] «Иммунный ответ» означает действие клетки иммунной системы (*например*, Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, естественных киллерных (NK) клеток, макрофагов, эозинофилов, тучных клеток, дендритных клеток и нейтрофилов) и растворимых макромолекул, продуцируемых любой из этих клеток или печенью (включая антитела, цитокины и систему комплемента), что приводит к избирательному нацеливанию, связыванию, повреждению, разрушению и/или удалению из организма позвоночного

вторгающихся патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, раковых или других аномальных клеток или, в случае аутоиммунитета или патологического воспаления, нормальных клеток или тканей человека.

[0090] Термин «иммунотерапия» относится к лечению субъекта, страдающего или подверженного риску заражения или страдающего рецидивом заболевания, с помощью способа, включающего индукцию, усиление, подавление или иное изменение иммунного ответа. Примеры иммунотерапии включают, но не ограничиваются ими, Т-клеточные терапии. Т-клеточная терапия может включать адоптивную Т-клеточную терапию, иммунотерапию опухоль-инфильтрирующими лимфоцитами (TIL), аутологичную клеточную терапию, сконструированную аутологичную клеточную терапию (eACT) и аллогенную трансплантацию Т-клеток.

[0091] Клетки, используемые в иммунотерапии, описанной в данном документе, могут быть получены из любого источника, известного в данной области техники. Например, Т-клетки могут быть дифференцированы *in vitro* из популяции гемопоэтических стволовых клеток, или Т-клетки могут быть получены от субъекта. Т-клетки могут быть получены, *например*, из моноклеарных клеток периферической крови, костного мозга, ткани лимфатических узлов, пуповинной крови, ткани тимуса, ткани из очага инфекции, асцита, плеврального выпота, ткани селезенки и опухолей. Кроме того, Т-клетки могут быть получены из одной или более линий Т-клеток, доступных в данной области техники. Т-клетки также могут быть получены из единицы крови, собранной у субъекта, с использованием любого количества методов, известных специалисту в данной области техники, таких как разделение и/или аферез FICOLL™. Дополнительные способы выделения Т-клеток для Т-клеточной терапии раскрыты в патентной публикации США № 2013/0287748, которая полностью включена в данный документ посредством ссылок. Иммунотерапия также может включать введение субъекту модифицированной клетки, причем модифицированная клетка экспрессирует CD3 и TCR, раскрытые в данном документе. В некоторых вариантах осуществления модифицированная клетка не является Т-клеткой.

[0092] «Пациент» в контексте данного документа включает любого человека, страдающего раком (*например*, лимфомой или лейкозом). Термины «субъект» и «пациент» используются в данном документе взаимозаменяемо.

[0093] Термины «пептид», «полипептид» и «белок» используются взаимозаменяемо и относятся к соединению, содержащему аминокислотные остатки, ковалентно связанные пептидными связями. Белок или пептид должен содержать по меньшей мере две аминокислоты и не ограничивается максимальным количеством аминокислот, которые

может содержать последовательность белка или пептида. Полипептиды включают в себя любой пептид или белок, содержащий две или более аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями. В контексте данного документа этот термин относится как к коротким цепям, которые в данной области техники также часто называются пептидами, олигопептидами и олигомерами, например, так и к более длинным цепям, которые в данной области техники обычно называются белками, которых существует множество типов. К «полипептидам» относятся, например, биологически активные фрагменты, по существу гомологичные полипептиды, олигопептиды, гомодимеры, гетеродимеры, варианты полипептидов, модифицированные полипептиды, производные, аналоги, гибридные белки, среди прочих. Полипептиды включают природные пептиды, рекомбинантные пептиды, синтетические пептиды или их комбинации.

[0094] «Стимуляция» в контексте данного документа относится к первичному ответу, индуцированному связыванием стимулирующей молекулы с ее распознаваемым лигандом, причем связывание опосредует событие передачи сигнала. «Стимулирующая молекула» представляет собой молекулу на Т-клетке, *например*, комплекс Т-клеточный рецептор (TCR)/CD3, который специфически связывается с распознаваемым стимулирующим лигандом, присутствующим на антигенпрезентирующей клетке. «Стимулирующий лиганд» представляет собой лиганд, который, когда присутствует на антигенпрезентирующей клетке (*например*, аAPC, дендритной клетке, В-клетке и т.п.), может специфически связываться со стимулирующей молекулой на Т-клетке, тем самым опосредуя первичный ответ Т-клетки, включая, помимо прочего, активацию, инициацию иммунного ответа, пролиферацию и т.п. Стимулирующие лиганды включают, но не ограничиваются ими, молекулу МНС класса I, загруженную пептидом, антитело к CD3, суперагонистическое антитело к CD28 и суперагонистическое антитело к CD2.

[0095] Термины «кондиционирование» и «предварительное кондиционирование» используются в данном документе взаимозаменяемо и указывают на подготовку пациента, нуждающегося в терапии Т-клетками для подходящего состояния. В контексте данного документа кондиционирование включает, но не ограничивается этим, уменьшение количества эндогенных лимфоцитов, удаление стока цитокинов, повышение уровня в сыворотке одного или более гомеостатических цитокинов или провоспалительных факторов, усиление эффекторной функции Т-клеток, вводимых после кондиционирования, усиление активации и/или доступности антигенпрезентирующих клеток, или любая их комбинация до начала Т-клеточной терапии. В одном варианте осуществления «кондиционирование» включает повышение уровня в сыворотке одного или более цитокинов, *например*, интерлейкина 7 (IL-7), интерлейкина 15 (IL-15), интерлейкина 10 (IL-

10), интерлейкина 5 (IL-5), гамма-индуцированного белка 10 (IP-10), интерлейкина 8 (IL-8), моноцитарного хемотаксического белка 1 (MCP-1), фактора роста плаценты (PLGF), С-реактивного белка (СРБ), растворимой молекулы межклеточной адгезии 1 (sICAM-1), растворимой молекулы сосудистой адгезии 1 (sVCAM-1) или любой их комбинации. В другом варианте осуществления «кондиционирование» включает повышение сывороточного уровня IL-7, IL-15, IP-10, MCP-1, PLGF, CRP или любой их комбинации.

[0096] «Лечение» или «процесс лечения» субъекта относится к любому типу вмешательства или процесса, выполняемого в отношении субъекта, или к введению активного вещества субъекту с целью обращения вспять, улучшения, облегчения, ингибирования или замедления или предотвращения начала, прогрессирования, развития, тяжести или рецидива симптома, осложнения, состояния или биохимических показателей, связанных с заболеванием. В одном варианте осуществления «лечение» или «процесс лечения» включает частичную ремиссию. В другом варианте осуществления «лечение» или «процесс лечения» включает полную ремиссию.

[0097] Использование альтернативы (*например*, «или») следует понимать как означающее один из вариантов, оба варианта или любую их комбинацию альтернатив. В контексте настоящего документа употребление формы единственного числа следует понимать как относящееся к «одному или нескольким» из любого из упомянутых или перечисленных компонентов.

[0098] Термины «около» или «состоящий по существу из» относятся к значению или составу, которые находятся в пределах допустимого диапазона ошибки для конкретного значения или состава, как определено специалистом в данной области техники, что будет частично зависеть от того, как значение или состав измеряется или определяется, *т.е.*, ограничений системы измерения. Например, термин «около» или «состоящий по существу из» может означать в пределах 1 или более 1 стандартного отклонения в соответствии с практикой в данной области техники. В качестве альтернативы термин «около» или «состоящий по существу из» может означать диапазон до 10% (*т.е.*, $\pm 10\%$). Например, около 3 мг может включать любое количество от 2,7 мг до 3,3 мг (в качестве 10%). Кроме того, особенно в отношении биологических систем или процессов, эти термины могут означать в пределах порядка величины или в пределах 5-кратного значения. Если в заявке и формуле изобретения представлены конкретные значения или составы, если не указано иное, следует предполагать, что значение термина «около» или «состоящий по существу из» находится в пределах допустимого диапазона ошибок для этого конкретного значения или состава.

[0099] В контексте настоящего документа любой диапазон концентраций,

процентный диапазон, диапазон соотношений или целочисленный диапазон следует понимать как включающий значение любого целого числа в указанном диапазоне и, при необходимости, части целого числа (например, одной десятой и одной сотой части целого числа), если не указано иное.

[0100] Различные аспекты изобретения более подробно описаны в следующих подразделах.

II. Композиции по раскрытию

[0101] Настоящее раскрытие относится к Т-клеточным рецепторам (TCR) или их антигенсвязывающим частям, которые специфически связываются с эпитопом на gp100, молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим их, и клеткам, содержащим TCR или молекулу нуклеиновой кислоты. Некоторые аспекты настоящего раскрытия относятся к способам лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающим ведение субъекту клетки, содержащей TCR, описанные в данном документе. Другие аспекты настоящего раскрытия относятся к эпитопу gp100, с которым связываются TCR, и молекулам HLA класса I, объединенным в комплекс с пептидом, включающим эпитоп gp100.

[0102] Т-клеточный рецептор, или TCR, представляет собой молекулу, находящуюся на поверхности Т-клеток или Т-лимфоцитов, которая отвечает за распознавание фрагментов антигена в виде пептидов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС). Связывание между TCR и антигенными пептидами имеет относительно низкую аффинность и является вырожденным: то есть, многие TCR распознают один и тот же антигенный пептид, и многие антигенные пептиды распознаются одним и тем же TCR.

[0103] TCR состоит из двух разных белковых цепей (то есть является гетеродимером). У человека в 95% Т-клеток TCR состоит из альфа (α) цепи и бета (β) цепи (кодируемых TRA и TRB, соответственно), тогда как в 5% Т-клеток TCR состоит из гамма и дельта (γ/δ) цепей (кодируемых TRG и TRD, соответственно). Данное соотношение меняется в процессе онтогенеза и при заболеваниях (например, лейкемии). Оно также различается между видами. Ортологи 4 локусов были картированы у различных видов. Каждый локус может продуцировать множество полипептидов с константными и переменными областями.

[0104] При взаимодействии TCR с антигенным пептидом и МНС (пептид/МНС) Т-лимфоцит активируется посредством сигнальной трансдукции, то есть ряда биохимических событий, опосредованных связанными ферментами, ко-рецепторами, специализированными адаптерными молекулами и активированными или

высвобождаемыми факторами транскрипции.

II.A. Молекулы нуклеиновых кислот

[0105] Определенные аспекты настоящего раскрытия относятся к молекулам нуклеиновых кислот, содержащим (i) первую нуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбинантный TCR или его антигенсвязывающую часть, которая специфически связывает человеческий gp100 («анти-gp100 TCR»); и (ii) вторую нуклеотидную последовательность, причем вторая нуклеотидная последовательность или полипептид, кодируемый второй нуклеотидной последовательностью, ингибирует экспрессию эндогенного TCR. В определенных вариантах осуществления вторая нуклеотидная последовательность представляет собой не встречающуюся в природе последовательность. В других вариантах осуществления вторая нуклеотидная последовательность является синтетической. В еще других вариантах осуществления вторая нуклеотидная последовательность включает последовательность, нацеленную на нуклеотидную последовательность, кодирующую эндогенный TCR. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR конкурирует с эталонным TCR за связывание с человеческим gp100. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR связывает тот же эпитоп или перекрывающийся эпитоп человеческого gp100, что и эталонный TCR.

[0106] В некоторых вариантах осуществления эталонный TCR содержит альфа-цепь и бета-цепь; причем альфа-цепь содержит определяющую комплементарность область 1 (CDR1), CDR2 и CDR3; бета-цепь содержит CDR1, CDR2 и CDR3; и причем эталонный TCR содержит CDR3 альфа-цепи, представленную в SEQ ID NO: 7, и CDR3 бета-цепи, представленную в SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 альфа-цепи присутствуют в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, а эталонный TCR содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 бета-цепи, присутствующие в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления эталонный TCR содержит альфа-цепь и бета-цепь, причем альфа-цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, а бета-цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

Таблица 3. Последовательности альфа-цепи и бета-цепи TCR

SEQ ID NO:	Цепь TCR	Последовательность

1	Альфа- цепь (аминокис лота)	METLLGLLILWLQLQWVSSKQEVTTQIPAALSVPEGENLVLNCSFT DSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQTSGRNLNASLDKSSG RSTLYIAASQPGDSATYLCVATDSWGKLQFGAGTQVVVTPDIQ NPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSVDVYITDK TVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPE SSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLQSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLR LWSSZ
17	Альфа- цепь (нуклеоти д)	ATGGAGACCCTCTTGGGCCTGCTTATCCTTTGGCTGCAGCTGC AATGGGTGAGCAGCAAACAGGAGGTGACGCAGATTCCTGCAG CTCTGAGTGTCCCAGAAGGAGAAAACCTTGGTTCTCAACTGCA GTTTCACTGATAGCGCTATTTACAACCTCCAGTGGTTTAGGCA GGACCCTGGGAAAGGTCTCACATCTCTGTTGCTTATTCAGTCA AGTCAGAGAGAGCAAACAAGTGGAAGACTTAATGCCTCGCTG GATAAATCATCAGGACGTAGTACTTTATACATTGCAGCTTCTC AGCCTGGTGACTCAGCCACCTACCTCTGTGCTGTGCAACTGA CAGCTGGGGGAAATTGCAGTTTGGAGCAGGGACCCAGGTTGT GGTCACCCCAGATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTACCA GCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTC ACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATT CTGATGTGTATATCACAGACAAAACCTGTGCTAGACATGAGGT CTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACA AATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTAT TCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGAAAGTTCCTGTGAT GTCAAGCTGGTCGAGAAAAGCTTTGAAACAGATACGAACCTA AACTTTCAAACCTGTCAGTGATTGGGTTCCGAATCCTCCTCC TGAAAGTGGCCGGGTTTAATCTGCTCATGACGCTGCGGCTGTG GTCCAGCTGA
2	Бета-цепь (аминокис лота)	MLSPDLPSAWNTRLLCHVMLCLLGAVSVAAGVIQSPRHLIKEK RETATLKCYPPIRHDTVYWYQQGPGQDPQFLISFYEKMQSDKGSI PDRFSAQQFSDYHSELNMSSLELGDSALYFCASSLLPEGTGRVSG YTFGSGTRLTVVEDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLA TGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLS SRLRVSATFWQNPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQI VSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVS ALVLMAMVKRKDFZ

18	Бета-цепь (нуклеотид)	ATGCTTAGTCCTGACCTGCCTGACTCTGCCTGGAACACCAGGC TCCTCTGCCATGTCATGCTTTGTCTCCTGGGAGCAGTTTCAGT GGCTGCTGGAGTCATCCAGTCCCCAAGACATCTGATCAAAGA AAAGAGGGGAAACAGCCACTCTGAAATGCTATCCTATCCCTAG ACACGACACTGTCTACTGGTACCAGCAGGGTCCAGGTCAGGA CCCCCAGTTCCTCATTTTCGTTTTATGAAAAGATGCAGAGCGAT AAAGGAAGCATCCCTGATCGATTCTCAGCTCAACAGTTCAGT GACTATCATTCTGAACTGAACATGAGCTCCTTGGAGCTGGGG GACTCAGCCCTGTACTTCTGTGCCAGCAGCCTCCTACCGGAAG GGACAGGCCGTGTAAGTGGCTACACCTTCGGTTCGGGGACCA GGTTAACCGTTGTAGAGGACCTGAACAAGGTGTTCCACCCG AGGTCGCTGTGTTTGAGCCATCAGAAGCAGAGATCTCCCACA CCCAAAAGGCCACACTGGTGTGCCTGGCCACAGGCTTCTTCCC TGACCACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGAATGGGAAGGAGGT GCACAGTGGGGTCAGCACGGACCCGCAGCCCCTCAAGGAGCA GCCCGCCCTCAATGACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTG AGGGTCTCGGCCACCTTCTGGCAGAACCCCCGCAACCACTTCC GCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCGGAGAATGACGAGT GGACCCAGGATAGGGCCAAACCCGTCACCCAGATCGTCAGCG CCGAGGCCTGGGGTAGAGCAGACTGTGGCTTTACCTCGGTGT CCTACCAGCAAGGGGTCTGTCTGCCACCATCCTCTATGAGAT CCTGCTAGGGAAGGCCACCCTGTATGCTGTGCTGGTCAGCGCC CTTGTGTTGATGGCCATGGTCAAGAGAAAGGATTTCTGA
----	--------------------------	--

П.А.1. TCR, кодируемый первой нуклеотидной последовательностью

[0107] Настоящее раскрытие относится к TCR, кодируемому первой нуклеотидной последовательностью, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR, кодируемый первой нуклеотидной последовательностью, содержит альфа-цепь и бета-цепь, причем альфа-цепь содержит переменный домен, содержащий альфа-цепь CDR1, альфа-цепь CDR2 и альфа-цепь CDR3; а бета-цепь содержит переменный домен, содержащий бета-цепь CDR1, бета-цепь CDR2 и бета-цепь CDR3. В некоторых вариантах осуществления CDR3 альфа-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7 (CAVATDSWGKLQF). В некоторых вариантах осуществления CDR3 бета-цепи анти-gp100

TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10 (CASSLLPEGTGRVSGYTF). В некоторых вариантах осуществления не-CDR области в альфа-цепи и/или бета-цепи являются дополнительно модифицированными, *например*, заменой или мутацией одной аминокислоты, двух аминокислот, трех аминокислот, четырех аминокислот, пяти аминокислот или шести аминокислот, в результате чего альфа-цепь и/или бета-цепь не являются встречающимися в природе. В некоторых вариантах осуществления изобретения замены или мутации могут улучшить TCR, описанные в данном документе, различными способами, *например*, аффинность связывания, специфичность связывания, стабильность, вязкость или любую их комбинацию.

[0108] В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR, кодируемый первой нуклеотидной последовательностью, содержит CDR1 альфа-цепи, причем CDR1 альфа-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 (DSAIYN). В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR, кодируемый первой нуклеотидной последовательностью, содержит CDR1 бета-цепи, причем CDR1 бета-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8 (IQSSQRE).

[0109] В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR, кодируемый первой нуклеотидной последовательностью, содержит CDR2 альфа-цепи, причем CDR2 альфа-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6 (PRHDT). В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR, кодируемый первой нуклеотидной последовательностью, содержит CDR2 бета-цепи, причем CDR2 бета-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9 (FYEKMQ).

[0110] В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR, кодируемый первой нуклеотидной последовательностью, содержит вариабельный домен альфа-цепи, имеющий по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с вариабельным доменом аминокислотной последовательности альфа-цепи, представленной в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR, кодируемый первой нуклеотидной последовательностью, содержит вариабельный домен альфа-цепи, имеющий по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с вариабельным доменом аминокислотной

последовательности альфа-цепи, представленной в SEQ ID NO: 1, причем анти-gp100 TCR содержит CDR3 альфа-цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR, кодируемый первой нуклеотидной последовательностью, содержит переменный домен альфа-цепи, присутствующий в аминокислотной последовательности альфа-цепи, представленной в SEQ ID NO: 1.

[0111] В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR, кодируемый первой нуклеотидной последовательностью, содержит переменный домен бета-цепи, имеющий по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с переменным доменом аминокислотной последовательности бета-цепи, представленной в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR, кодируемый первой нуклеотидной последовательностью, содержит переменный домен бета-цепи, имеющий по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с переменным доменом аминокислотной последовательности бета-цепи, представленной в SEQ ID NO: 2, причем анти-gp100 TCR содержит CDR3 бета-цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR, кодируемый первой нуклеотидной последовательностью, содержит переменный домен бета-цепи, представленный аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 2.

[0112] В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR, кодируемый первым нуклеотидом, дополнительно содержит константную область альфа-цепи, константную область бета-цепи или как константную область альфа-цепи, так и константную область бета-цепи. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR, кодируемый первой нуклеотидной последовательностью, содержит константную область альфа-цепи, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с константной областью аминокислотной последовательности альфа-цепи, представленной в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR, кодируемый первой нуклеотидной последовательностью,

содержит константную область альфа-цепи, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с константной областью аминокислотной последовательности альфа-цепи, представленной в SEQ ID NO: 1, причем анти-gp100 TCR содержит CDR3 альфа-цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR, кодируемый первой нуклеотидной последовательностью, содержит константную область альфа-цепи, присутствующую в аминокислотной последовательности альфа-цепи, представленной в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR, кодируемый первым нуклеотидом, дополнительно содержит константную область альфа-цепи, которая отличается от эндогенных, *например*, встречающихся в природе, константных областей альфа-цепи. В некоторых вариантах осуществления константная область альфа-цепи содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5 аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности константной области аминокислотной последовательности альфа-цепи, представленной в SEQ ID NO: 1.

[0113] В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR, кодируемый первой нуклеотидной последовательностью, содержит константную область бета-цепи, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с константной областью аминокислотной последовательности бета-цепи, представленной в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR, кодируемый первой нуклеотидной последовательностью, содержит константную область бета-цепи, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с константной областью аминокислотной последовательности бета-цепи, представленной в SEQ ID NO: 2, причем анти-gp100 TCR содержит CDR3 бета-цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR, кодируемый первой нуклеотидной последовательностью, содержит константную область бета-цепи, присутствующую в аминокислотной последовательности, представленной в

SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR, кодируемый первым нуклеотидом, дополнительно содержит константную область бета-цепи, которая отличается от эндогенных, *например*, встречающихся в природе, константных областей бета-цепи. В некоторых вариантах осуществления константная область бета-цепи содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5 аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности константной области аминокислотной последовательности бета-цепи, представленной в SEQ ID NO: 2.

[0114] В определенных вариантах осуществления анти-gp100 TCR, кодируемый первой нуклеотидной последовательностью, содержит альфа-цепь, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью альфа-цепи, представленной в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR, кодируемый первой нуклеотидной последовательностью, содержит альфа-цепь, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью альфа-цепи, представленной в SEQ ID NO: 1, причем анти-gp100 TCR содержит CDR3 альфа-цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR, кодируемый первой нуклеотидной последовательностью, содержит альфа-цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1.

[0115] В определенных вариантах осуществления анти-gp100 TCR, кодируемый первой нуклеотидной последовательностью, содержит бета-цепь, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью бета-цепи, представленной в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR, кодируемый первой нуклеотидной последовательностью, содержит бета-цепь, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере

около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью бета-цепи, представленной в SEQ ID NO: 2, причем анти-gp100 TCR содержит CDR3 бета-цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR, кодируемый первой нуклеотидной последовательностью, содержит бета-цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

[0116] В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR, кодируемый первой нуклеотидной последовательностью, содержит константную область альфа-цепи, константную область бета-цепи или обе; и причем константная область альфа-цепи, константная область бета-цепи или обе содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5 замен в целевой последовательности относительно соответствующей аминокислотной последовательности эндогенного TCR.

II.A.2. Эпитопы

[0117] В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR, кодируемый первой нуклеотидной последовательностью, связывает тот же эпитоп, что и эталонный TCR. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR связывается с эпитопом gp100, содержащим аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13 (VYFFLPDHL). В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR связывается с эпитопом gp100, состоящим из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления эпитоп состоит из intron4 gp100 (SEQ ID NO: 52), *например*, «gp100- intron4».

[0118] В определенных вариантах осуществления эпитоп образует комплекс с молекулой HLA класса I. Система антигенов лейкоцитов человека (HLA) (главный комплекс гистосовместимости [МНС] у людей) является важной частью иммунной системы и контролируется генами, расположенными на хромосоме 6. Она кодирует молекулы клеточной поверхности, специализированные для представления антигенных пептидов Т-клеточному рецептору (TCR) на Т-клетках. (См. также Обзор иммунной системы.) Молекулы МНС, которые представляют антиген (Ag), делятся на 2 основных класса: молекулы МНС класса I и молекулы МНС класса II.

[0119] Молекулы МНС класса I присутствуют в виде трансмембранных гликопротеинов на поверхности всех нуклеированных клеток. Неповрежденные молекулы класса I состоят из альфа-тяжелой цепи, связанной с молекулой бета-2 микроглобулина.

Тяжелая цепь состоит из 2 пептид-связывающих доменов, Ig-подобного домена и трансмембранной области с цитоплазматическим концевым фрагментом. Тяжелая цепь молекулы класса I кодируется генами в локусах HLA-A, HLA-B и HLA-C. Т-клетки, экспрессирующие молекулы CD8, вступают в реакцию с молекулами МНС класса I. Эти лимфоциты часто выполняют цитотоксическую функцию, что требует от них способности распознавать любую инфицированную клетку. Поскольку каждая ядродержащая клетка экспрессирует молекулы МНС класса I, все инфицированные клетки могут служить в качестве антигенпрезентирующих клеток для CD8 Т-клеток (CD8 связывается с неполиморфной частью тяжелой цепи класса I). Некоторые гены МНС класса I кодируют неклассические молекулы МНС, такие как HLA-G (который может играть роль в защите плода от иммунного ответа матери) и HLA-E (который представляет пептиды определенным рецепторам на естественных киллерных [NK] клетках).

[0120] В некоторых вариантах осуществления молекула HLA класса 1 выбрана из аллелей HLA-A, HLA-B и HLA-C. В некоторых вариантах осуществления молекула HLA класса 1 выбрана из аллелей HLA-E, HLA-F и HLA-G. В определенных вариантах осуществления молекула HLA класса 1 представляет собой аллель HLA-A. В определенных вариантах осуществления молекула HLA класса 1 представляет собой аллель HLA-B. В определенных вариантах осуществления молекула HLA класса 1 представляет собой аллель HLA-C.

[0121] Многие аллели HLA-A, HLA-B и HLA-C известны в данной области техники, и любой из известных аллелей может быть использован в данном раскрытии. Обновленный список аллелей HLA доступен по ссылке на сайте hla.alleles.org/ (дата последнего посещения: 27 февраля 2019 года). В некоторых вариантах осуществления молекула HLA класса 1 представляет собой аллель HLA-A, выбранный из HLA-A*01, HLA-A*02, HLA-A*03, HLA-A*11, HLA-A*23, HLA-A*24, HLA-A*25, HLA-A*26, HLA-A*29, HLA-A*30, HLA-A*31, HLA-A*32, HLA-A*33, HLA-A*34, HLA-A*36, HLA-A*43, HLA-A*66, HLA-A*68, HLA-A*69, HLA-A*74 и HLA-A*80. В определенных вариантах осуществления аллель HLA-A представляет собой аллель HLA-A*24:01. В определенных вариантах осуществления аллель HLA-A представляет собой аллель HLA-A*24:02. В определенных вариантах осуществления аллель HLA-A представляет собой аллель HLA-A*24:03. В определенных вариантах осуществления аллель HLA-A представляет собой аллель HLA-A*24:11. В определенных вариантах осуществления аллель HLA-A представляет собой аллель HLA-A*24:23. В определенных вариантах осуществления аллель HLA-A представляет собой аллель HLA-A*24:24. В определенных вариантах осуществления аллель HLA-A представляет собой аллель HLA-A*24:25. В определенных вариантах

осуществления аллель HLA-A представляет собой аллель HLA-A*24:26.

[0122] В определенных вариантах осуществления молекула HLA класса 1 представляет собой аллель HLA-A, выбранный из группы, состоящей из HLA-A*24:02:01:01, HLA-A*24:02:01:02, HLA-A*24:02:01:03, HLA-A*24:02:01:04, HLA-A*24:02:01:05, HLA-A*24:02:01:06, HLA-A*24:02:01:07, HLA-A*24:02:01:08, HLA-A*24:02:01:09, HLA-A*24:02:01:10, HLA-A*24:02:01:11, HLA-A*24:02:01:12, HLA-A*24:02:01:13, HLA-A*24:02:01:14, HLA-A*24:02:01:15, HLA-A*24:02:01:16, HLA-A*24:02:01:17, HLA-A*24:02:01:18, HLA-A*24:02:01:19, HLA-A*24:02:01:20, HLA-A*24:02:02, HLA-A*24:02:03, HLA-A*24:02:04, HLA-A*24:02:05, HLA-A*24:02:06, HLA-A*24:02:07, HLA-A*24:02:08, HLA-A*24:02:09, HLA-A*24:02:10, HLA-A*24:02:100, HLA-A*24:02:101, HLA-A*24:02:102, HLA-A*24:02:103, HLA-A*24:02:104, HLA-A*24:02:105, HLA-A*24:02:106, HLA-A*24:02:107, HLA-A*24:02:108, HLA-A*24:02:109, HLA-A*24:02:11, HLA-A*24:02:110, HLA-A*24:02:111, HLA-A*24:02:112, HLA-A*24:02:113, HLA-A*24:02:114, HLA-A*24:02:115, HLA-A*24:02:12, HLA-A*24:02:13, HLA-A*24:02:14, HLA-A*24:02:15, HLA-A*24:02:16, HLA-A*24:02:17, HLA-A*24:02:18, HLA-A*24:02:19, HLA-A*24:02:20, HLA-A*24:02:21, HLA-A*24:02:22, HLA-A*24:02:23, HLA-A*24:02:24, HLA-A*24:02:25, HLA-A*24:02:26, HLA-A*24:02:27, HLA-A*24:02:28, HLA-A*24:02:29, HLA-A*24:02:30, HLA-A*24:02:31, HLA-A*24:02:32, HLA-A*24:02:33, HLA-A*24:02:34, HLA-A*24:02:35, HLA-A*24:02:36, HLA-A*24:02:37, HLA-A*24:02:38, HLA-A*24:02:39, HLA-A*24:02:40, HLA-A*24:02:41, HLA-A*24:02:42, HLA-A*24:02:43, HLA-A*24:02:44, HLA-A*24:02:45, HLA-A*24:02:46, HLA-A*24:02:47, HLA-A*24:02:48, HLA-A*24:02:49, HLA-A*24:02:50, HLA-A*24:02:51, HLA-A*24:02:52, HLA-A*24:02:53, HLA-A*24:02:54, HLA-A*24:02:55, HLA-A*24:02:56, HLA-A*24:02:57, HLA-A*24:02:58, HLA-A*24:02:59, HLA-A*24:02:60, HLA-A*24:02:61, HLA-A*24:02:62, HLA-A*24:02:63, HLA-A*24:02:64, HLA-A*24:02:65, HLA-A*24:02:66, HLA-A*24:02:67, HLA-A*24:02:68, HLA-A*24:02:69, HLA-A*24:02:70, HLA-A*24:02:71, HLA-A*24:02:72, HLA-A*24:02:73, HLA-A*24:02:74, HLA-A*24:02:75, HLA-A*24:02:76, HLA-A*24:02:77, HLA-A*24:02:78, HLA-A*24:02:79, HLA-A*24:02:80, HLA-A*24:02:81, HLA-A*24:02:82, HLA-A*24:02:83, HLA-A*24:02:84, HLA-A*24:02:85, HLA-A*24:02:86, HLA-A*24:02:87, HLA-A*24:02:88, HLA-A*24:02:89, HLA-A*24:02:90, HLA-A*24:02:91, HLA-A*24:02:92, HLA-A*24:02:93, HLA-A*24:02:94, HLA-A*24:02:95, HLA-A*24:02:96, HLA-A*24:02:97, HLA-A*24:02:98 и HLA-A*24:02:99.

В определенных вариантах осуществления молекула HLA класса 1 представляет собой аллель HLA-A, выбранный из группы, состоящей из HLA-A*24:03:01:01, HLA-A*24:03:01:02, HLA-A*24:03:02, HLA-A*24:03:03, HLA-A*24:03:04, HLA-A*24:04, HLA-A*24:05:01, HLA-A*24:05:02, HLA-A*24:06, HLA-A*24:07:01, HLA-A*24:07:02, HLA-

A*24:08, HLA-A*24:09, HLA-A*24:100, HLA-A*24:101, HLA-A*24:102, HLA-A*24:103, HLA-A*24:104, HLA-A*24:105, HLA-A*24:106, HLA-A*24:107, HLA-A*24:108, HLA-A*24:109, HLA-A*24:10:01, HLA-A*24:10:02, HLA-A*24:110, HLA-A*24:111, HLA-A*24:112, HLA-A*24:113, HLA-A*24:114, HLA-A*24:115, HLA-A*24:116, HLA-A*24:117, HLA-A*24:118, HLA-A*24:119, HLA-A*24:11, HLA-A*24:120, HLA-A*24:121, HLA-A*24:122, HLA-A*24:123, HLA-A*24:124, HLA-A*24:125, HLA-A*24:126, HLA-A*24:127, HLA-A*24:128, HLA-A*24:129, HLA-A*24:130, HLA-A*24:131, HLA-A*24:132, HLA-A*24:133, HLA-A*24:134, HLA-A*24:135:01, HLA-A*24:135:02, HLA-A*24:136, HLA-A*24:137, HLA-A*24:138, HLA-A*24:139, HLA-A*24:13:01, HLA-A*24:13:02, HLA-A*24:140, HLA-A*24:141, HLA-A*24:142:01, HLA-A*24:142:02, HLA-A*24:143, HLA-A*24:144, HLA-A*24:145, HLA-A*24:146, HLA-A*24:147, HLA-A*24:148, HLA-A*24:149, HLA-A*24:14:01:01, HLA-A*24:14:01:02, HLA-A*24:14:01:03, HLA-A*24:15, HLA-A*24:150, HLA-A*24:151, HLA-A*24:152, HLA-A*24:153, HLA-A*24:154, HLA-A*24:155, HLA-A*24:156, HLA-A*24:157, HLA-A*24:158, HLA-A*24:159, HLA-A*24:160, HLA-A*24:161, HLA-A*24:162, HLA-A*24:163, HLA-A*24:164, HLA-A*24:165, HLA-A*24:166, HLA-A*24:167, HLA-A*24:168, HLA-A*24:169, HLA-A*24:17, HLA-A*24:170, HLA-A*24:171, HLA-A*24:172:01, HLA-A*24:172:02, HLA-A*24:173, HLA-A*24:174, HLA-A*24:175, HLA-A*24:176, HLA-A*24:177, HLA-A*24:178, HLA-A*24:179, HLA-A*24:18, HLA-A*24:180, HLA-A*24:181, HLA-A*24:182, HLA-A*24:183, HLA-A*24:184, HLA-A*24:185, HLA-A*24:186, HLA-A*24:187, HLA-A*24:188, HLA-A*24:189, HLA-A*24:19, HLA-A*24:190, HLA-A*24:191, HLA-A*24:192, HLA-A*24:193, HLA-A*24:194, HLA-A*24:195, HLA-A*24:196, HLA-A*24:197, HLA-A*24:198, HLA-A*24:199, HLA-A*24:200, HLA-A*24:201, HLA-A*24:202, HLA-A*24:203, HLA-A*24:204, HLA-A*24:205, HLA-A*24:206, HLA-A*24:207:01, HLA-A*24:207:02, HLA-A*24:208:01, HLA-A*24:208:02, HLA-A*24:209, HLA-A*24:20:01:01, HLA-A*24:20:01:02, HLA-A*24:210, HLA-A*24:212, HLA-A*24:213, HLA-A*24:214, HLA-A*24:215, HLA-A*24:216, HLA-A*24:217, HLA-A*24:218, HLA-A*24:219, HLA-A*24:21:01, HLA-A*24:21:02, HLA-A*24:21:03, HLA-A*24:22, HLA-A*24:220, HLA-A*24:221, HLA-A*24:222, HLA-A*24:223, HLA-A*24:224, HLA-A*24:225:01, HLA-A*24:225:02, HLA-A*24:226:01, HLA-A*24:226:02, HLA-A*24:227, HLA-A*24:228, HLA-A*24:229, HLA-A*24:23, HLA-A*24:230, HLA-A*24:231, HLA-A*24:232, HLA-A*24:233, HLA-A*24:234, HLA-A*24:235, HLA-A*24:236, HLA-A*24:237, HLA-A*24:238, HLA-A*24:239, HLA-A*24:24, HLA-A*24:240, HLA-A*24:241, HLA-A*24:242, HLA-A*24:243, HLA-A*24:244, HLA-A*24:245, HLA-A*24:246, HLA-A*24:247, HLA-A*24:248, HLA-A*24:249, HLA-A*24:25, HLA-A*24:250, HLA-A*24:251, HLA-A*24:252, HLA-A*24:253, HLA-A*24:254, HLA-A*24:255, HLA-A*24:256, HLA-

A*24:257, HLA-A*24:258, HLA-A*24:259, HLA-A*24:26, HLA-A*24:260, HLA-A*24:261, HLA-A*24:262, HLA-A*24:263, HLA-A*24:264, HLA-A*24:265, HLA-A*24:266, HLA-A*24:267, HLA-A*24:268, HLA-A*24:269, HLA-A*24:27, HLA-A*24:270, HLA-A*24:271, HLA-A*24:272, HLA-A*24:273, HLA-A*24:274, HLA-A*24:275, HLA-A*24:276, HLA-A*24:277, HLA-A*24:278, HLA-A*24:279, HLA-A*24:28, HLA-A*24:280, HLA-A*24:281, HLA-A*24:282, HLA-A*24:283, HLA-A*24:284, HLA-A*24:285, HLA-A*24:286, HLA-A*24:287, HLA-A*24:288, HLA-A*24:289, HLA-A*24:29, HLA-A*24:290, HLA-A*24:291, HLA-A*24:292, HLA-A*24:293, HLA-A*24:294, HLA-A*24:295, HLA-A*24:296, HLA-A*24:297, HLA-A*24:298, HLA-A*24:299, HLA-A*24:30, HLA-A*24:300, HLA-A*24:301, HLA-A*24:302, HLA-A*24:303, HLA-A*24:304, HLA-A*24:305, HLA-A*24:306, HLA-A*24:307, HLA-A*24:308, HLA-A*24:309, HLA-A*24:31, HLA-A*24:310:01, HLA-A*24:310:02, HLA-A*24:311, HLA-A*24:312, HLA-A*24:313:01, HLA-A*24:313:02, HLA-A*24:314, HLA-A*24:315, HLA-A*24:316, HLA-A*24:317, HLA-A*24:318, HLA-A*24:319, HLA-A*24:32, HLA-A*24:320, HLA-A*24:321, HLA-A*24:322, HLA-A*24:323, HLA-A*24:324, HLA-A*24:325, HLA-A*24:326, HLA-A*24:327, HLA-A*24:328, HLA-A*24:329, HLA-A*24:33, HLA-A*24:330, HLA-A*24:331, HLA-A*24:332, HLA-A*24:333, HLA-A*24:334, HLA-A*24:335, HLA-A*24:336, HLA-A*24:337, HLA-A*24:338, HLA-A*24:339, HLA-A*24:34, HLA-A*24:340, HLA-A*24:341, HLA-A*24:342, HLA-A*24:343, HLA-A*24:344, HLA-A*24:345, HLA-A*24:346, HLA-A*24:347:01, HLA-A*24:347:02, HLA-A*24:348, HLA-A*24:349, HLA-A*24:35, HLA-A*24:350, HLA-A*24:351, HLA-A*24:352, HLA-A*24:353, HLA-A*24:354, HLA-A*24:355, HLA-A*24:356, HLA-A*24:357, HLA-A*24:358, HLA-A*24:359, HLA-A*24:360, HLA-A*24:361, HLA-A*24:362, HLA-A*24:363, HLA-A*24:364, HLA-A*24:365, HLA-A*24:366, HLA-A*24:367, HLA-A*24:368, HLA-A*24:369, HLA-A*24:36, HLA-A*24:37, HLA-A*24:370, HLA-A*24:371, HLA-A*24:372, HLA-A*24:373, HLA-A*24:374, HLA-A*24:375, HLA-A*24:376, HLA-A*24:377, HLA-A*24:378, HLA-A*24:379, HLA-A*24:38, HLA-A*24:380, HLA-A*24:381, HLA-A*24:382, HLA-A*24:383, HLA-A*24:384, HLA-A*24:385, HLA-A*24:386, HLA-A*24:387, HLA-A*24:388, HLA-A*24:389, HLA-A*24:39, HLA-A*24:390, HLA-A*24:391, HLA-A*24:392, HLA-A*24:393, HLA-A*24:394, HLA-A*24:395, HLA-A*24:396, HLA-A*24:397, HLA-A*24:398, HLA-A*24:399, HLA-A*24:400, HLA-A*24:401, HLA-A*24:402, HLA-A*24:403, HLA-A*24:404, HLA-A*24:405, HLA-A*24:406, HLA-A*24:407, HLA-A*24:408, HLA-A*24:409, HLA-A*24:40, HLA-A*24:41, HLA-A*24:410, HLA-A*24:411, HLA-A*24:412, HLA-A*24:413, HLA-A*24:414, HLA-A*24:415, HLA-A*24:416, HLA-A*24:417, HLA-A*24:418, HLA-A*24:419, HLA-A*24:42, HLA-A*24:420, HLA-A*24:421, HLA-A*24:422, HLA-A*24:423, HLA-A*24:424, HLA-A*24:425, HLA-A*24:426, HLA-A*24:427, HLA-

A*24:428, HLA-A*24:429, HLA-A*24:43, HLA-A*24:430, HLA-A*24:431, HLA-A*24:432, HLA-A*24:433, HLA-A*24:44, HLA-A*24:45, HLA-A*24:46, HLA-A*24:47, HLA-A*24:48, HLA-A*24:49, HLA-A*24:50, HLA-A*24:51, HLA-A*24:52, HLA-A*24:53, HLA-A*24:54, HLA-A*24:55, HLA-A*24:56, HLA-A*24:57, HLA-A*24:58, HLA-A*24:59, HLA-A*24:60, HLA-A*24:61, HLA-A*24:62, HLA-A*24:63, HLA-A*24:64, HLA-A*24:66, HLA-A*24:67, HLA-A*24:68, HLA-A*24:69, HLA-A*24:70, HLA-A*24:71, HLA-A*24:72, HLA-A*24:73, HLA-A*24:74:01, HLA-A*24:74:02, HLA-A*24:75, HLA-A*24:76, HLA-A*24:77, HLA-A*24:78, HLA-A*24:79, HLA-A*24:80, HLA-A*24:81, HLA-A*24:82, HLA-A*24:83, HLA-A*24:84, HLA-A*24:85, HLA-A*24:86, HLA-A*24:87, HLA-A*24:88, HLA-A*24:89, HLA-A*24:90:01, HLA-A*24:90:02, HLA-A*24:91, HLA-A*24:92, HLA-A*24:93, HLA-A*24:94, HLA-A*24:95, HLA-A*24:96, HLA-A*24:97, HLA-A*24:98 и HLA-A*24:99.

II.A.3 Вторая нуклеотидная последовательность

[0123] Вторая нуклеотидная последовательность молекулы нуклеиновой кислоты, раскрытая в данном документе, может представлять собой любую последовательность или может кодировать любой полипептид, который способен ингибировать экспрессию эндогенного TCR. В некоторых вариантах осуществления вторая нуклеотидная последовательность представляет собой одну или более миРНК. В некоторых вариантах осуществления одна или более миРНК являются комплементарными целевой последовательности в нуклеотидной последовательности, кодирующей константную область эндогенного TCR. В определенных вариантах осуществления одна или более миРНК являются комплементарными целевой последовательности в нуклеотидной последовательности, кодирующей константную область TCR человека дикого типа. В некоторых вариантах осуществления одна или более миРНК являются комплементарными целевой последовательности в нуклеотидной последовательности, кодирующей константную область альфа-цепи TCR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления одна или более миРНК являются комплементарными целевой последовательности в нуклеотидной последовательности, кодирующей константную область бета-цепи TCR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления одна или более миРНК включают (i) одну или более миРНК, комплементарных целевой последовательности в пределах нуклеотидной последовательности, кодирующей константную область альфа-цепи TCR дикого типа, и (ii) одну или более миРНК, комплементарных целевой последовательности в пределах нуклеотидной последовательности, кодирующей константную область бета-цепи TCR дикого типа.

[0124] В некоторых вариантах осуществления одна или более миРНК содержат

нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 53-56 (Таблица 4). В некоторых вариантах осуществления вторая нуклеотидная последовательность молекулы нуклеиновой кислоты кодирует одну или более миРНК, причем одна или более миРНК являются комплементарными целевой последовательности в пределах нуклеотидной последовательности, кодирующей константную область альфа-цепи TCR дикого типа, и причем одна или более миРНК включают последовательности нуклеиновых кислот, представленные в SEQ ID NO: 53 и 54.

Таблица 4. Последовательности миРНК

SEQ ID NO:	миРНК	Последовательность (нуклеотиды 1-19 представляют собой рибонуклеотиды; нуклеотиды 20-21 представляют собой дезоксирибонуклеотиды)
53	siRNA-TCRa-1	GUAAGGAUUCUGAUGUGUATT
54	siRNA-TCRa-2	UACACAUCAGAAUCCUUA CTT
55	siRNA-TCRb-1	CCACCAUCCUCUAUGAGAUTT
56	siRNA-TCRb-2	AUCUCAUAGAGGAUGGUGGTT

[0125] В некоторых вариантах осуществления вторая нуклеотидная последовательность молекулы нуклеиновой кислоты кодирует одну или более миРНК, причем одна или более миРНК являются комплементарными целевой последовательности в пределах нуклеотидной последовательности, кодирующей константную область бета-цепи TCR дикого типа, и причем одна или более миРНК включают последовательности нуклеиновых кислот, представленные в SEQ ID NO: 55 и 56. В некоторых вариантах осуществления вторая нуклеотидная последовательность молекулы нуклеиновой кислоты кодирует одну или более миРНК, причем одна или более миРНК содержат (i) одну или более миРНК, которые являются комплементарными целевой последовательности в пределах нуклеотидной последовательности, кодирующей константную область альфа-цепи TCR дикого типа, причем одна или более миРНК включают последовательности нуклеиновых кислот, представленные в SEQ ID NO: 53 и 54; и (ii) одну или более миРНК, которые являются комплементарными целевой последовательности в пределах

нуклеотидной последовательности, кодирующей константную область бета-цепи TCR дикого типа, причем одна или более миРНК включают последовательности нуклеиновых кислот, представленные в SEQ ID NO: 55 и 56.

[0126] В некоторых вариантах осуществления вторая нуклеотидная последовательность молекулы нуклеиновой кислоты включает SEQ ID NO: 53-56. В некоторых вариантах осуществления вторая нуклеотидная последовательность включает SEQ ID NO: 53-56, причем одна или более из SEQ ID NO: 53-56 разделены одной или более нуклеиновыми кислотами, которые не кодируют миРНК. В определенных вариантах осуществления одна или более миРНК выбраны из миРНК, раскрытых в публикации США № 2010/0273213 A1, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

[0127] В некоторых вариантах осуществления вторая нуклеотидная последовательность молекулы нуклеиновой кислоты кодирует белок, причем белок способен ингибировать экспрессию эндогенного TCR, *например*, TCR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления вторая нуклеотидная последовательность кодирует Cas9.

II.A.3 Векторы

[0128] Определенные аспекты настоящего раскрытия относятся к векторам, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, раскрытую в данном документе. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вирусную частицу или вирус. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой бактериальный вектор.

[0129] В определенных вариантах осуществления вектор представляет собой ретровирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор выбран из группы, состоящей из аденовирусного вектора, лентивируса, вектора вируса Сендай, бакуловирусного вектора, вектора вируса Эпштейна — Барра, паповавирусного вектора, вектора вируса осповакцины, вектора вируса простого герпеса, и вектора аденоассоциированного вируса (AAV). В конкретных вариантах осуществления, вирусный вектор представляет собой вектор AAV. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой лентивирус. В конкретных вариантах осуществления, вирусный вектор представляет собой вектор AAV. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вирус Сендай. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой гибридный вектор. Примеры гибридных векторов, которые можно использовать по настоящему раскрытию, можно найти в публикации Huang and Kamihira,

Biotechnol. Adv. 31(2):208-23 (2103), которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

II.B. Рекомбинантные Т-клеточные рецепторы (TCR)

[0130] Определенные аспекты настоящего раскрытия относятся к рекомбинантным Т-клеточным рецепторам (TCR) или их антигенсвязывающей части, которая специфически связывается с человеческим gp100 («анти-gp100 TCR»). В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR кодируется описанной в данном документе молекулой нуклеиновой кислоты.

[0131] В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR конкурирует с эталонным TCR за связывание с человеческим gp100. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR связывает тот же эпитоп или перекрывающийся эпитоп человеческого gp100, что и эталонный TCR. В некоторых вариантах осуществления эталонный TCR содержит альфа-цепь и бета-цепь, причем альфа-цепь эталонного TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления бета-цепь эталонного TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

[0132] В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR содержит альфа-цепь и бета-цепь, причем альфа-цепь содержит константную область, и причем бета-цепь содержит константную область; причем константная область альфа-цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5 аминокислотных замен относительно константной области альфа-цепи, присутствующей в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR содержит альфа-цепь и бета-цепь, причем альфа-цепь содержит константную область и бета-цепь содержит константную область; причем константная область бета-цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5 аминокислотных замен относительно константной области бета-цепи, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

[0133] В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR содержит альфа-цепь и бета-цепь, причем альфа-цепь содержит константную область, и причем бета-цепь содержит константную область; причем (i) константная область альфа-цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5 аминокислотных замен

относительно константной области альфа-цепи, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1; и (ii) константная область бета-цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5 аминокислотных замен относительно константной области бета-цепи, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

[0134] В некоторых вариантах осуществления альфа-цепь анти-gp100 TCR содержит переменный домен, содержащий CDR1 альфа-цепи, CDR2 альфа-цепи и CDR3 альфа-цепи; а бета-цепь анти-gp100 TCR содержит переменный домен, содержащий CDR1 бета-цепи, CDR2 бета-цепи и CDR3 бета-цепи. В некоторых вариантах осуществления CDR3 альфа-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления CDR3 бета-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10.

[0135] В некоторых вариантах осуществления CDR1 альфа-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления CDR1 бета-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8.

[0136] В некоторых вариантах осуществления CDR2 альфа-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления CDR2 бета-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9.

[0137] В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR содержит переменный домен альфа-цепи, имеющий по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с переменным доменом аминокислотной последовательности альфа-цепи, представленной в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR содержит переменный домен альфа-цепи, имеющий по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с переменным доменом аминокислотной последовательности альфа-цепи, представленной в SEQ ID NO: 1, причем анти-gp100 TCR содержит CDR3 альфа-цепи, содержащую аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR содержит переменный домен альфа-цепи, присутствующий в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1.

[0138] В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR содержит переменный домен бета-цепи, имеющий по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с переменным доменом аминокислотной последовательности бета-цепи, представленной в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR содержит переменный домен бета-цепи, имеющий по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с переменным доменом аминокислотной последовательности бета-цепи, представленной в SEQ ID NO: 2, причем анти-gp100 TCR содержит CDR3 бета-цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR содержит переменный домен бета-цепи, представленный аминокислотной последовательностью бета-цепи, приведенной в SEQ ID NO: 2.

[0139] В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR, кодируемый первым нуклеотидом, дополнительно содержит константную область альфа-цепи, константную область бета-цепи или как константную область альфа-цепи, так и константную область бета-цепи. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR содержит константную область альфа-цепи, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с константной областью аминокислотной последовательности альфа-цепи, представленной в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR содержит константную область альфа-цепи, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с константной областью аминокислотной последовательности альфа-цепи, представленной в SEQ ID NO: 1, причем анти-gp100 TCR содержит CDR3 альфа-цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7. В

некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR содержит константную область альфа-цепи, присутствующую в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR, кодируемый первым нуклеотидом, дополнительно содержит константную область альфа-цепи, которая отличается от эндогенных, *например*, встречающихся в природе, константных областей альфа-цепи. В некоторых вариантах осуществления константная область альфа-цепи содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5 аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности константной области аминокислотной последовательности альфа-цепи, представленной в SEQ ID NO: 1.

[0140] В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR содержит константную область бета-цепи, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с константной областью аминокислотной последовательности бета-цепи, представленной в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR содержит константную область бета-цепи, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с константной областью аминокислотной последовательности бета-цепи, представленной в SEQ ID NO: 2, причем анти-gp100 TCR содержит CDR3 бета-цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR содержит константную область бета-цепи, присутствующую в аминокислотной последовательности бета-цепи, представленной в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR, кодируемый первым нуклеотидом, дополнительно содержит константную область бета-цепи, которая отличается от эндогенных, *например*, встречающихся в природе, константных областей бета-цепи. В некоторых вариантах осуществления константная область бета-цепи содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5 аминокислотных замен относительно аминокислотной последовательности константной области аминокислотной последовательности бета-цепи, представленной в SEQ ID NO: 2.

[0141] В определенных вариантах осуществления анти-gp100 TCR содержит альфа-

цепь, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью альфа-цепи, представленной в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR содержит альфа-цепь, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью альфа-цепи, представленной в SEQ ID NO: 1, причем анти-gp100 TCR содержит CDR3 альфа-цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR содержит альфа-цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1.

[0142] В определенных вариантах осуществления анти-gp100 TCR содержит бета-цепь, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью бета-цепи, представленной в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR содержит бета-цепь, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью бета-цепи, представленной в SEQ ID NO: 2, причем анти-gp100 TCR содержит CDR3 бета-цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR содержит бета-цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

[0143] В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR содержит константную область альфа-цепи, константную область бета-цепи или обе; и причем константная область альфа-цепи, константная область бета-цепи или обе содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5 замен в целевой последовательности относительно соответствующей аминокислотной последовательности эндогенного TCR.

II.B.2. Эпитопы

[0144] В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR связывает тот же эпитоп, что и эталонный TCR. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR связывается с эпитопом gp100, содержащим аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления анти-gp100 TCR связывается с эпитопом gp100, состоящим из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления эпитоп состоит из аминокислотных остатков intron4 gp100 (SEQ ID NO: 52), *например*, «gp100- intron4».

[0145] В определенных вариантах осуществления эпитоп образует комплекс с молекулой HLA класса I. В некоторых вариантах осуществления молекула HLA класса I выбрана из аллелей HLA-A, HLA-B и HLA-C. В некоторых вариантах осуществления молекула HLA класса I выбрана из аллелей HLA-E, HLA-F и HLA-G. В определенных вариантах осуществления молекула HLA класса I представляет собой аллель HLA-A. В определенных вариантах осуществления молекула HLA класса I представляет собой аллель HLA-B. В определенных вариантах осуществления молекула HLA класса I представляет собой аллель HLA-C.

[0146] Многие аллели HLA-A, HLA-B и HLA-C известны в данной области техники, и любой из известных аллелей может быть использован в данном раскрытии. Обновленный список аллелей HLA доступен по ссылке на сайте hla.alleles.org/ (дата последнего посещения: 27 февраля 2019 года). В некоторых вариантах осуществления молекула HLA класса I представляет собой аллель HLA-A, выбранный из HLA-A*01, HLA-A*02, HLA-A*03, HLA-A*11, HLA-A*23, HLA-A*24, HLA-A*25, HLA-A*26, HLA-A*29, HLA-A*30, HLA-A*31, HLA-A*32, HLA-A*33, HLA-A*34, HLA-A*36, HLA-A*43, HLA-A*66, HLA-A*68, HLA-A*69, HLA-A*74 и HLA-A*80. В определенных вариантах осуществления аллель HLA-A представляет собой аллель HLA-A*24:01. В определенных вариантах осуществления аллель HLA-A представляет собой аллель HLA-A*24:02. В определенных вариантах осуществления аллель HLA-A представляет собой аллель HLA-A*24:03. В определенных вариантах осуществления аллель HLA-A представляет собой аллель HLA-A*24:11. В определенных вариантах осуществления аллель HLA-A представляет собой аллель HLA-A*24:23. В определенных вариантах осуществления аллель HLA-A представляет собой аллель HLA-A*24:24. В определенных вариантах осуществления аллель HLA-A представляет собой аллель HLA-A*24:25. В определенных вариантах осуществления аллель HLA-A представляет собой аллель HLA-A*24:26.

[0147] В определенных вариантах осуществления молекула HLA класса I представляет собой аллель HLA-A, выбранный из группы, состоящей из HLA-

A*24:02:01:01, HLA-A*24:02:01:02, HLA-A*24:02:01:03, HLA-A*24:02:01:04, HLA-A*24:02:01:05, HLA-A*24:02:01:06, HLA-A*24:02:01:07, HLA-A*24:02:01:08, HLA-A*24:02:01:09, HLA-A*24:02:01:10, HLA-A*24:02:01:11, HLA-A*24:02:01:12, HLA-A*24:02:01:13, HLA-A*24:02:01:14, HLA-A*24:02:01:15, HLA-A*24:02:01:16, HLA-A*24:02:01:17, HLA-A*24:02:01:18, HLA-A*24:02:01:19, HLA-A*24:02:01:20, HLA-A*24:02:02, HLA-A*24:02:03, HLA-A*24:02:04, HLA-A*24:02:05, HLA-A*24:02:06, HLA-A*24:02:07, HLA-A*24:02:08, HLA-A*24:02:09, HLA-A*24:02:10, HLA-A*24:02:100, HLA-A*24:02:101, HLA-A*24:02:102, HLA-A*24:02:103, HLA-A*24:02:104, HLA-A*24:02:105, HLA-A*24:02:106, HLA-A*24:02:107, HLA-A*24:02:108, HLA-A*24:02:109, HLA-A*24:02:11, HLA-A*24:02:110, HLA-A*24:02:111, HLA-A*24:02:112, HLA-A*24:02:113, HLA-A*24:02:114, HLA-A*24:02:115, HLA-A*24:02:12, HLA-A*24:02:13, HLA-A*24:02:14, HLA-A*24:02:15, HLA-A*24:02:16, HLA-A*24:02:17, HLA-A*24:02:18, HLA-A*24:02:19, HLA-A*24:02:20, HLA-A*24:02:21, HLA-A*24:02:22, HLA-A*24:02:23, HLA-A*24:02:24, HLA-A*24:02:25, HLA-A*24:02:26, HLA-A*24:02:27, HLA-A*24:02:28, HLA-A*24:02:29, HLA-A*24:02:30, HLA-A*24:02:31, HLA-A*24:02:32, HLA-A*24:02:33, HLA-A*24:02:34, HLA-A*24:02:35, HLA-A*24:02:36, HLA-A*24:02:37, HLA-A*24:02:38, HLA-A*24:02:39, HLA-A*24:02:40, HLA-A*24:02:41, HLA-A*24:02:42, HLA-A*24:02:43, HLA-A*24:02:44, HLA-A*24:02:45, HLA-A*24:02:46, HLA-A*24:02:47, HLA-A*24:02:48, HLA-A*24:02:49, HLA-A*24:02:50, HLA-A*24:02:51, HLA-A*24:02:52, HLA-A*24:02:53, HLA-A*24:02:54, HLA-A*24:02:55, HLA-A*24:02:56, HLA-A*24:02:57, HLA-A*24:02:58, HLA-A*24:02:59, HLA-A*24:02:60, HLA-A*24:02:61, HLA-A*24:02:62, HLA-A*24:02:63, HLA-A*24:02:64, HLA-A*24:02:65, HLA-A*24:02:66, HLA-A*24:02:67, HLA-A*24:02:68, HLA-A*24:02:69, HLA-A*24:02:70, HLA-A*24:02:71, HLA-A*24:02:72, HLA-A*24:02:73, HLA-A*24:02:74, HLA-A*24:02:75, HLA-A*24:02:76, HLA-A*24:02:77, HLA-A*24:02:78, HLA-A*24:02:79, HLA-A*24:02:80, HLA-A*24:02:81, HLA-A*24:02:82, HLA-A*24:02:83, HLA-A*24:02:84, HLA-A*24:02:85, HLA-A*24:02:86, HLA-A*24:02:87, HLA-A*24:02:88, HLA-A*24:02:89, HLA-A*24:02:90, HLA-A*24:02:91, HLA-A*24:02:92, HLA-A*24:02:93, HLA-A*24:02:94, HLA-A*24:02:95, HLA-A*24:02:96, HLA-A*24:02:97, HLA-A*24:02:98 и HLA-A*24:02:99.

В определенных вариантах осуществления молекула HLA класса 1 представляет собой аллель HLA-A, выбранный из группы, состоящей из HLA-A*24:03:01:01, HLA-A*24:03:01:02, HLA-A*24:03:02, HLA-A*24:03:03, HLA-A*24:03:04, HLA-A*24:04, HLA-A*24:05:01, HLA-A*24:05:02, HLA-A*24:06, HLA-A*24:07:01, HLA-A*24:07:02, HLA-A*24:08, HLA-A*24:09, HLA-A*24:100, HLA-A*24:101, HLA-A*24:102, HLA-A*24:103, HLA-A*24:104, HLA-A*24:105, HLA-A*24:106, HLA-A*24:107, HLA-A*24:108, HLA-A*24:109, HLA-A*24:10:01, HLA-A*24:10:02, HLA-A*24:110, HLA-A*24:111, HLA-

A*24:112, HLA-A*24:113, HLA-A*24:114, HLA-A*24:115, HLA-A*24:116, HLA-A*24:117, HLA-A*24:118, HLA-A*24:119, HLA-A*24:120, HLA-A*24:121, HLA-A*24:122, HLA-A*24:123, HLA-A*24:124, HLA-A*24:125, HLA-A*24:126, HLA-A*24:127, HLA-A*24:128, HLA-A*24:129, HLA-A*24:130, HLA-A*24:131, HLA-A*24:132, HLA-A*24:133, HLA-A*24:134, HLA-A*24:135:01, HLA-A*24:135:02, HLA-A*24:136, HLA-A*24:137, HLA-A*24:138, HLA-A*24:139, HLA-A*24:13:01, HLA-A*24:13:02, HLA-A*24:140, HLA-A*24:141, HLA-A*24:142:01, HLA-A*24:142:02, HLA-A*24:143, HLA-A*24:144, HLA-A*24:145, HLA-A*24:146, HLA-A*24:147, HLA-A*24:148, HLA-A*24:149, HLA-A*24:14:01:01, HLA-A*24:14:01:02, HLA-A*24:14:01:03, HLA-A*24:15, HLA-A*24:150, HLA-A*24:151, HLA-A*24:152, HLA-A*24:153, HLA-A*24:154, HLA-A*24:155, HLA-A*24:156, HLA-A*24:157, HLA-A*24:158, HLA-A*24:159, HLA-A*24:160, HLA-A*24:161, HLA-A*24:162, HLA-A*24:163, HLA-A*24:164, HLA-A*24:165, HLA-A*24:166, HLA-A*24:167, HLA-A*24:168, HLA-A*24:169, HLA-A*24:17, HLA-A*24:170, HLA-A*24:171, HLA-A*24:172:01, HLA-A*24:172:02, HLA-A*24:173, HLA-A*24:174, HLA-A*24:175, HLA-A*24:176, HLA-A*24:177, HLA-A*24:178, HLA-A*24:179, HLA-A*24:18, HLA-A*24:180, HLA-A*24:181, HLA-A*24:182, HLA-A*24:183, HLA-A*24:184, HLA-A*24:185, HLA-A*24:186, HLA-A*24:187, HLA-A*24:188, HLA-A*24:189, HLA-A*24:19, HLA-A*24:190, HLA-A*24:191, HLA-A*24:192, HLA-A*24:193, HLA-A*24:194, HLA-A*24:195, HLA-A*24:196, HLA-A*24:197, HLA-A*24:198, HLA-A*24:199, HLA-A*24:200, HLA-A*24:201, HLA-A*24:202, HLA-A*24:203, HLA-A*24:204, HLA-A*24:205, HLA-A*24:206, HLA-A*24:207:01, HLA-A*24:207:02, HLA-A*24:208:01, HLA-A*24:208:02, HLA-A*24:209, HLA-A*24:20:01:01, HLA-A*24:20:01:02, HLA-A*24:210, HLA-A*24:212, HLA-A*24:213, HLA-A*24:214, HLA-A*24:215, HLA-A*24:216, HLA-A*24:217, HLA-A*24:218, HLA-A*24:219, HLA-A*24:21:01, HLA-A*24:21:02, HLA-A*24:21:03, HLA-A*24:22, HLA-A*24:220, HLA-A*24:221, HLA-A*24:222, HLA-A*24:223, HLA-A*24:224, HLA-A*24:225:01, HLA-A*24:225:02, HLA-A*24:226:01, HLA-A*24:226:02, HLA-A*24:227, HLA-A*24:228, HLA-A*24:229, HLA-A*24:23, HLA-A*24:230, HLA-A*24:231, HLA-A*24:232, HLA-A*24:233, HLA-A*24:234, HLA-A*24:235, HLA-A*24:236, HLA-A*24:237, HLA-A*24:238, HLA-A*24:239, HLA-A*24:24, HLA-A*24:240, HLA-A*24:241, HLA-A*24:242, HLA-A*24:243, HLA-A*24:244, HLA-A*24:245, HLA-A*24:246, HLA-A*24:247, HLA-A*24:248, HLA-A*24:249, HLA-A*24:25, HLA-A*24:250, HLA-A*24:251, HLA-A*24:252, HLA-A*24:253, HLA-A*24:254, HLA-A*24:255, HLA-A*24:256, HLA-A*24:257, HLA-A*24:258, HLA-A*24:259, HLA-A*24:26, HLA-A*24:260, HLA-A*24:261, HLA-A*24:262, HLA-A*24:263, HLA-A*24:264, HLA-A*24:265, HLA-A*24:266, HLA-A*24:267, HLA-A*24:268, HLA-A*24:269, HLA-A*24:27, HLA-A*24:270, HLA-A*24:271,

HLA-A*24:272, HLA-A*24:273, HLA-A*24:274, HLA-A*24:275, HLA-A*24:276, HLA-A*24:277, HLA-A*24:278, HLA-A*24:279, HLA-A*24:28, HLA-A*24:280, HLA-A*24:281, HLA-A*24:282, HLA-A*24:283, HLA-A*24:284, HLA-A*24:285, HLA-A*24:286, HLA-A*24:287, HLA-A*24:288, HLA-A*24:289, HLA-A*24:29, HLA-A*24:290, HLA-A*24:291, HLA-A*24:292, HLA-A*24:293, HLA-A*24:294, HLA-A*24:295, HLA-A*24:296, HLA-A*24:297, HLA-A*24:298, HLA-A*24:299, HLA-A*24:30, HLA-A*24:300, HLA-A*24:301, HLA-A*24:302, HLA-A*24:303, HLA-A*24:304, HLA-A*24:305, HLA-A*24:306, HLA-A*24:307, HLA-A*24:308, HLA-A*24:309, HLA-A*24:31, HLA-A*24:310:01, HLA-A*24:310:02, HLA-A*24:311, HLA-A*24:312, HLA-A*24:313:01, HLA-A*24:313:02, HLA-A*24:314, HLA-A*24:315, HLA-A*24:316, HLA-A*24:317, HLA-A*24:318, HLA-A*24:319, HLA-A*24:32, HLA-A*24:320, HLA-A*24:321, HLA-A*24:322, HLA-A*24:323, HLA-A*24:324, HLA-A*24:325, HLA-A*24:326, HLA-A*24:327, HLA-A*24:328, HLA-A*24:329, HLA-A*24:33, HLA-A*24:330, HLA-A*24:331, HLA-A*24:332, HLA-A*24:333, HLA-A*24:334, HLA-A*24:335, HLA-A*24:336, HLA-A*24:337, HLA-A*24:338, HLA-A*24:339, HLA-A*24:34, HLA-A*24:340, HLA-A*24:341, HLA-A*24:342, HLA-A*24:343, HLA-A*24:344, HLA-A*24:345, HLA-A*24:346, HLA-A*24:347:01, HLA-A*24:347:02, HLA-A*24:348, HLA-A*24:349, HLA-A*24:35, HLA-A*24:350, HLA-A*24:351, HLA-A*24:352, HLA-A*24:353, HLA-A*24:354, HLA-A*24:355, HLA-A*24:356, HLA-A*24:357, HLA-A*24:358, HLA-A*24:359, HLA-A*24:360, HLA-A*24:361, HLA-A*24:362, HLA-A*24:363, HLA-A*24:364, HLA-A*24:365, HLA-A*24:366, HLA-A*24:367, HLA-A*24:368, HLA-A*24:369, HLA-A*24:36, HLA-A*24:37, HLA-A*24:370, HLA-A*24:371, HLA-A*24:372, HLA-A*24:373, HLA-A*24:374, HLA-A*24:375, HLA-A*24:376, HLA-A*24:377, HLA-A*24:378, HLA-A*24:379, HLA-A*24:38, HLA-A*24:380, HLA-A*24:381, HLA-A*24:382, HLA-A*24:383, HLA-A*24:384, HLA-A*24:385, HLA-A*24:386, HLA-A*24:387, HLA-A*24:388, HLA-A*24:389, HLA-A*24:39, HLA-A*24:390, HLA-A*24:391, HLA-A*24:392, HLA-A*24:393, HLA-A*24:394, HLA-A*24:395, HLA-A*24:396, HLA-A*24:397, HLA-A*24:398, HLA-A*24:399, HLA-A*24:400, HLA-A*24:401, HLA-A*24:402, HLA-A*24:403, HLA-A*24:404, HLA-A*24:405, HLA-A*24:406, HLA-A*24:407, HLA-A*24:408, HLA-A*24:409, HLA-A*24:40, HLA-A*24:41, HLA-A*24:410, HLA-A*24:411, HLA-A*24:412, HLA-A*24:413, HLA-A*24:414, HLA-A*24:415, HLA-A*24:416, HLA-A*24:417, HLA-A*24:418, HLA-A*24:419, HLA-A*24:42, HLA-A*24:420, HLA-A*24:421, HLA-A*24:422, HLA-A*24:423, HLA-A*24:424, HLA-A*24:425, HLA-A*24:426, HLA-A*24:427, HLA-A*24:428, HLA-A*24:429, HLA-A*24:43, HLA-A*24:430, HLA-A*24:431, HLA-A*24:432, HLA-A*24:433, HLA-A*24:44, HLA-A*24:45, HLA-A*24:46, HLA-A*24:47, HLA-A*24:48, HLA-A*24:49, HLA-A*24:50, HLA-A*24:51, HLA-A*24:52, HLA-A*24:53, HLA-A*24:54,

HLA-A*24:55, HLA-A*24:56, HLA-A*24:57, HLA-A*24:58, HLA-A*24:59, HLA-A*24:60, HLA-A*24:61, HLA-A*24:62, HLA-A*24:63, HLA-A*24:64, HLA-A*24:66, HLA-A*24:67, HLA-A*24:68, HLA-A*24:69, HLA-A*24:70, HLA-A*24:71, HLA-A*24:72, HLA-A*24:73, HLA-A*24:74:01, HLA-A*24:74:02, HLA-A*24:75, HLA-A*24:76, HLA-A*24:77, HLA-A*24:78, HLA-A*24:79, HLA-A*24:80, HLA-A*24:81, HLA-A*24:82, HLA-A*24:83, HLA-A*24:84, HLA-A*24:85, HLA-A*24:86, HLA-A*24:87, HLA-A*24:88, HLA-A*24:89, HLA-A*24:90:01, HLA-A*24:90:02, HLA-A*24:91, HLA-A*24:92, HLA-A*24:93, HLA-A*24:94, HLA-A*24:95, HLA-A*24:96, HLA-A*24:97, HLA-A*24:98 и HLA-A*24:99.

II.B.3. Биспецифические Т-клеточные рецепторы (TCR)

[0148] Определенные аспекты настоящего раскрытия относятся к биспецифическому TCR, содержащему первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен, причем первый антигенсвязывающий домен содержит TCR или его антигенсвязывающую часть, раскрытую в данном документе. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент («scFv»).

[0149] В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен специфически связывается с белком, экспрессированным на поверхности Т-клетки. Любой белок, экспрессируемый на поверхности Т-клетки, может быть мишенью описанного в данном документе биспецифического антитела. В некоторых вариантах осуществления белок, экспрессируемый на поверхности Т-клетки, не экспрессируется другими клетками. В некоторых вариантах осуществления белок, экспрессируемый на поверхности Т-клетки, экспрессируется на поверхности одной или более других иммунных клеток человека. В некоторых вариантах осуществления белок, экспрессируемый на поверхности Т-клетки, экспрессируется на поверхности одной или более иммунных клеток человека, но не экспрессируется на поверхности неиммунной клетки человека. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен специфически связывается с белком, экспрессируемым на поверхности Т-клетки, выбранной из CD3, CD2, CD5, CD6, CD8, CD11a (LFA-1 α), CD43, CD45 и CD53. В определенных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен специфически связывается с CD3. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен содержит scFv.

[0150] В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен связаны или ассоциированы ковалентной связью. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен связаны пептидной связью.

II.C. Клетки, экспрессирующие TCR

[0151] Определенные аспекты настоящего раскрытия относятся к клеткам, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, раскрытую в данном документе, вектор, раскрытый в данном документе, рекомбинантный TCR, раскрытый в данном документе, биспецифический TCR, раскрытый в данном документе, или любой их комбинации. В настоящем раскрытии может быть использована любая клетка.

[0152] В определенных вариантах осуществления клетка экспрессирует CD3. Экспрессия CD3 может быть природного происхождения, *например*, CD3 экспрессируется из последовательности нуклеиновой кислоты, которая эндогенно экспрессируется клеткой. Например, Т-клетки и естественные киллерные (NK) клетки естественным образом экспрессируют CD3. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой Т-клетку или естественную киллерную клетку. В определенных вариантах осуществления клетка представляет собой Т-клетку, выбранную из естественной киллерной Т-клетки (NKT) и врожденной лимфоидной клетки (ILC).

[0153] В некоторых вариантах осуществления изобретения Т-клетка является выделенной из организма субъекта-человека. В некоторых вариантах осуществления субъект-человек является тем же субъектом, который в конечном итоге получит Т-клеточную терапию. В других вариантах осуществления субъект является субъектом-донором, причем субъект-донор не является тем же субъектом, который будет получать Т-клеточную терапию.

[0154] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку, которая естественным образом не экспрессирует CD3, при этом клетка была модифицирована для экспрессии CD3. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит трансген, кодирующий CD3, при этом трансген экспрессируется клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит трансген, кодирующий белок, который активирует экспрессию эндогенного CD3 клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит трансген, кодирующий белок или миРНК, который ингибирует ингибитор экспрессии CD3 в клетке. В некоторых вариантах осуществления трансген включен в геном клетки. В некоторых вариантах осуществления трансген не включен в геном клетки.

[0155] В некоторых вариантах осуществления клетка, которая модифицирована для экспрессии CD3, является выделенной из организма субъекта-человека. В некоторых вариантах осуществления субъект-человек является тем же субъектом, который в конечном итоге получит клеточную терапию. В других вариантах осуществления субъект является

субъектом-донором, причем субъект-донор не является тем же субъектом, который будет получать клеточную терапию.

II.D. Молекулы HLA класса I

[0156] Определенные аспекты настоящего раскрытия относятся к молекуле HLA класса I, объединенной в комплекс с пептидом, причем пептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления пептид состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 13.

[0157] В некоторых вариантах осуществления молекула HLA класса I представляет собой аллель HLA-A, HLA-B или HLA-C. В некоторых вариантах осуществления молекула HLA класса I представляет собой аллель HLA-E, HLA-F или HLA-G. В некоторых вариантах осуществления молекула HLA класса I представляет собой аллель HLA-A, выбранный из HLA-A*01, HLA-A*02, HLA-A*03, HLA-A*11, HLA-A*23, HLA-A*24, HLA-A*25, HLA-A*26, HLA-A*29, HLA-A*30, HLA-A*31, HLA-A*32, HLA-A*33, HLA-A*34, HLA-A*36, HLA-A*43, HLA-A*66, HLA-A*68, HLA-A*69, HLA-A*74 и HLA-A*80. В определенных вариантах осуществления аллель HLA-A представляет собой аллель HLA-A*24:01. В определенных вариантах осуществления аллель HLA-A представляет собой аллель HLA-A*24:02. В определенных вариантах осуществления аллель HLA-A представляет собой аллель HLA-A*24:03. В определенных вариантах осуществления аллель HLA-A представляет собой аллель HLA-A*24:11. В определенных вариантах осуществления аллель HLA-A представляет собой аллель HLA-A*24:23. В определенных вариантах осуществления аллель HLA-A представляет собой аллель HLA-A*24:24. В определенных вариантах осуществления аллель HLA-A представляет собой аллель HLA-A*24:25. В определенных вариантах осуществления аллель HLA-A представляет собой аллель HLA-A*24:26. В некоторых вариантах осуществления аллель HLA представляет собой любой аллель HLA, описанный в данном документе, *например, выше*.

[0158] В некоторых вариантах осуществления молекула HLA класса I содержит альфа-цепь и $\beta 2m$. В некоторых вариантах осуществления альфа-цепь содержит домен $\alpha 1$, домен $\alpha 2$, домен $\alpha 3$. В некоторых вариантах осуществления $\beta 2m$ содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере, около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления

последовательность альфа-цепи выбрана из любой последовательности белка HLA, доступной на сайте hla.alleles.org (дата последнего посещения: 27 февраля 2019 года).

[0159] В некоторых вариантах осуществления молекула HLA класса I представляет собой мономер. В некоторых вариантах осуществления молекула HLA класса I представляет собой димер. В некоторых вариантах осуществления молекула HLA класса I представляет собой мультимер. В некоторых вариантах осуществления молекула HLA класса I представляет собой тример. В некоторых вариантах осуществления молекула HLA класса I представляет собой тетрамер. В некоторых вариантах осуществления молекула HLA класса I представляет собой пентамер.

[0160] Определенные аспекты настоящего раскрытия относятся к антигенпрезентирующим клеткам (APC), содержащим молекулу HLA класса I, раскрытую в данном документе. В определенных вариантах осуществления изобретения APC экспрессировала молекулу HLA класса I на поверхности APC. В определенных вариантах осуществления APC содержит более одной молекулы HLA класса I, описанной в данном документе.

II.D. Вакцины

[0161] Определенные аспекты настоящего раскрытия относятся к противораковой вакцине, содержащей пептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления противораковая вакцина содержит пептид, который состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления вакцина дополнительно содержит один или более наполнителей. В некоторых вариантах осуществления вакцина дополнительно содержит один или более дополнительных пептидов. В некоторых вариантах осуществления один или более дополнительных пептидов содержат один или более дополнительных эпитопов.

III. Способы по раскрытию

[0162] Определенные аспекты настоящего раскрытия относятся к способам лечения рака у нуждающегося в этом субъекта. Другие аспекты настоящего раскрытия относятся к способам конструирования антиген-нацеливающей клетки. Другие аспекты настоящего раскрытия относятся к способам обогащения целевой популяции Т-клеток, полученных от субъекта-человека.

III.A. Способы лечения рака

[0163] Определенные аспекты настоящего раскрытия относятся к способам лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающим введение субъекту молекулы нуклеиновой кислоты, раскрытой в данном документе, рекомбинантного TCR, раскрытого в данном документе, биспецифического TCR, раскрытого в данном документе, эпитопа, раскрытого в данном документе, или молекулы HLA класса I, раскрытой в данном документе, или вектора или клетки, включающей любое из вышеперечисленного.

[0164] В некоторых вариантах осуществления рак выбран из меланомы, рака костей, рака почек, рака предстательной железы, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака легких, кожной или внутриглазной злокачественной меланомы, рака поджелудочной железы, рака кожи, рака головы или шеи, рака матки, рака яичников, рака прямой кишки, рака анальной области, рака желудка, рака яичек, рака матки, карциномы фаллопиевых труб, карциномы эндометрия, карциномы шейки матки, карциномы влагалища, карцинома вульвы, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы (НХЛ), первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомы (ПМВКЛ), диффузной В-крупноклеточной лимфомы (ДВККЛ), фолликулярной лимфомы (ФЛ), трансформированной фолликулярной лимфомы, лимфомы маргинальной зоны селезенки (ЛМЗС), рака пищевода, рака тонкой кишки, рака эндокринной системы, рака щитовидной железы, рака паращитовидной железы, рака надпочечников, саркомы мягких тканей, рака уретры, рака полового члена, хронического или острого лейкоза, острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), хронического миелоидного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) (включая не Т-клеточный ОЛЛ), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), солидных опухолей детского возраста, лимфоцитарной лимфомы, рака мочевого пузыря, рака почки или мочеточника, карцинома почечной лоханки, новообразования центральной нервной системы (ЦНС), первичной лимфомы ЦНС, опухолевого ангиогенеза, опухоли оси позвоночника, глиомы ствола головного мозга, аденомы гипофиза, саркомы Капоши, эпидермоидного рака, плоскоклеточного рака, Т-клеточной лимфомы, виды рака, индуцированные окружающей средой, включая рак, индуцированный асбестом, другие В-клеточные злокачественные опухоли, а также комбинации указанных видов рака. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой меланому.

[0165] В некоторых вариантах осуществления рак представляет является рецидивирующим. В некоторых вариантах осуществления рак является рефрактерным. В некоторых вариантах осуществления рак является распространенным. В некоторых вариантах осуществления рак является метастатическим.

[0166] В некоторых вариантах осуществления раскрытые в данном документе способы лечат рак у субъекта. В некоторых вариантах осуществления раскрытые в данном

документе способы уменьшают выраженность одного или более симптомов рака. В некоторых вариантах осуществления раскрытые в данном документе способы уменьшают размер или количество раковых опухолей. В некоторых вариантах осуществления способы, раскрытые в данном документе, повышают общую выживаемость субъекта по сравнению с субъектом, которому не проводилось лечение способами, раскрытыми в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способы, раскрытые в данном документе, повышают выживаемость без прогрессирования у субъекта по сравнению с субъектом, которому не проводилось лечение способами, раскрытыми в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способы, раскрытые в данном документе, приводят к частичному ответу у субъекта. В некоторых вариантах осуществления способы, раскрытые в данном документе, приводят к полному ответу у субъекта.

[0167] В некоторых вариантах осуществления способы, раскрытые в данном документе, включают лечение рака у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту клетки, описанной в данном документе, при этом клетка содержит молекулу нуклеиновой кислоты, раскрытую в данном документе, вектор, раскрытый в данном документе, рекомбинантный TCR, раскрытый в данном документе и/или биспецифическое антитело, описанное в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку, которая модифицирована для экспрессии CD3.

[0168] В некоторых вариантах осуществления клетка, *например*, Т-клетка, получена от субъекта. В некоторых вариантах осуществления клетка, *например*, Т-клетка, получена от донора, отличного от субъекта.

[0169] В некоторых вариантах осуществления субъекту проводят предварительное кондиционирование перед введением клеток. Предварительное кондиционирование может включать любое вещество, которое способствует функции и/или выживанию Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления предварительное кондиционирование включает введение субъекту химиотерапевтического препарата, цитокина, белка, малой молекулы или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления предварительное кондиционирование включает введение субъекту интерлейкина. В некоторых вариантах осуществления предварительное кондиционирование включает введение IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21 или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления предварительная подготовка включает в себя введение циклофосфида, флударабина или обоих препаратов. В некоторых вариантах осуществления предварительное кондиционирование включает введение витамина С, ингибитора АКТ, ATRA (везаноида, третиноина), рапамицина или любой их комбинации.

III.B. Способы конструирования антиген-нацеливающей клетки

[0170] Определенные аспекты настоящего раскрытия относятся к способам конструирования антиген-нацеливающей клетки. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой gp100 антиген. В некоторых вариантах осуществления способ включает трансдукцию клетки молекулой нуклеиновой кислоты, раскрытой в данном документе, или вектором, раскрытым в данном документе. Клетка может представлять собой любую клетку, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой Т-клетку, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку, которая модифицирована для экспрессии CD3, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетка, *например*, Т-клетка, получена от субъекта, нуждающегося в Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления клетка получена от донора, отличного от субъекта, нуждающегося в Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой Т-клетку или естественную киллерную клетку.

III.C. Способы обогащения целевой популяции Т-клеток

[0171] Определенные аспекты настоящего раскрытия относятся к способам обогащения целевой популяции Т-клеток, полученных от субъекта-человека. В некоторых вариантах осуществления способ включает приведение Т-клеток в контакт с молекулой HLA класса I, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способ включает приведение Т-клеток в контакт с APC, раскрытой в данном документе. В некоторых вариантах осуществления после приведения в контакт обогащенная популяция Т-клеток содержит большее количество Т-клеток, способных связывать молекулу HLA класса I, по сравнению с количеством Т-клеток, способных связывать молекулу HLA класса I до приведения в контакт.

[0172] В некоторых вариантах осуществления способ включает приведение Т-клеток *in vitro* в контакт с пептидом, причем пептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления способ включает приведение Т-клеток *in vitro* в контакт с пептидом, причем пептид состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления после приведения в контакт обогащенная популяция Т-клеток содержит большее количество Т-клеток, способных связывать молекулу HLA класса I, по сравнению с количеством Т-клеток, способных связывать

молекулу HLA класса I до приведения в контакт.

[0173] Некоторые аспекты настоящего раскрытия относятся к способу отбора Т-клетки, способной нацеливаться на опухолевую клетку. В некоторых вариантах осуществления способ включает приведение популяции выделенных Т-клеток *in vitro* в контакт с пептидом, причем пептид состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки получены от субъекта-человека.

[0174] Т-клетки, полученные от субъекта-человека, могут быть любыми Т-клетками, описанными в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения Т-клетки, полученные от субъекта-человека, являются инфильтрирующими опухоль лимфоцитами (TIL).

[0175] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту-человеку обогащенных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления субъекту проводят предварительное кондиционирование перед получением ним Т-клеток, как описано в данном документе.

[0176] Все различные аспекты, варианты осуществления изобретения и варианты лечения, описанные в данном документе, могут быть объединены в любых вариациях без исключения.

[0177] Все публикации, патенты и заявки на патент, упомянутые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были конкретно и отдельно указаны для включения посредством ссылки.

[0178] После общего описания настоящего раскрытия, дальнейшее понимание может быть получено путем обращения к примерам, представленным в данном документе. Эти примеры предназначены только для иллюстрации и не являются ограничивающими.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

[0179] TIL были выделены у пациента с метастатической меланомой, затем поликлонально размножены *in vitro* и исследована их специфичность к антигену gp100 в отношении аллеля HLA-A*24:02. Комбинация структурного анализа с использованием мультимеров пептид/HLA (pHLA) и функционального анализа была использована для измерения антиген-специфических Т-клеточных ответов. Мы окрашивали Т-клетки с

помощью мультимера pHLA с пептидом gp100-intron4, который был известен ранее (фиг. 1). ТП показали положительную реакцию на мультимер A*24:02/gp100-intron4. Мультимер-положительные Т-клетки секретировали детектируемый IFN-γ специфичным для HLA пептидом образом в соответствии с анализом ELISPOT (фиг. 2).

[0180] Были собраны мультимер-положительные противоопухолевые Т-клетки, и их гены TCR были молекулярно клонированы (фиг. 3; SEQ ID NO: 1 и 2). Антигенная специфичность и функциональная реактивность клонированного TCR были подтверждены с помощью мультимерного окрашивания и анализа ELISPOT восстановленных с помощью TCR Т-клеток. При восстановлении на первичных Т-клетках, A*24:02/gp100-intron4 TCR-трансдуцированные Т-клетки были успешно окрашены когнатным мультимером (фиг. 4) и вступали в сильную реакцию с пептидом gp100-intron4, представленным на поверхности молекул A*24:02 (фиг. 5). Важно отметить, что эти клетки были способны распознавать совпадающие с A*24:02 опухолевые клетки, в которые не вводили пептиды, естественным образом экспрессирующие ген gp100 (фиг. 6). Хотя обе линии клеток меланомы Malme-3М и SK-MEL-28 являются отрицательными по A*24:02, они эндогенно экспрессируют ген gp100. Когда молекулы A*24:02 экспрессировались эктопически, обе линии клеток меланомы успешно распознавались Т-клетками, трансдуцированными A*24:02/gp100-intron4 TCR. Более того, клетки меланомы A375, в которых отсутствует эндогенная экспрессия как A*24:02, так и gp100, становились реактивными по отношению к Т-клеткам, трансдуцированным A*24:02/gp100-intron4 TCR только тогда, когда оба гена A*24:02 и gp100-intron4 трансдуцировались (но ни один из отдельных генов) (фиг. 6-8). Данные результаты отчетливо демонстрируют, что Т-клетки, трансдуцированные A*24:02/gp100-intron4 TCR, были достаточно активными для распознавания опухолевых клеток и, что клонированный A*24:02/gp100-intron4 TCR был опухолереактивный.

[0181] Gp100 является одним из общих антигенов, которые были многообещающими и широко изучались в терапии биспецифическими активаторами Т-клеток (BiTE), и клинические испытания, направленные на gp100, продолжаются у пациентов с метастатической увеальной меланомой с применением IMCgp100, который является биспецифическим биологическим препаратом, состоящим из растворимого TCR, распознающего антиген gp100, слитого с анти-CD3 scFV, который перенаправляет Т-клеточный лизис клеток меланомы, экспрессирующих gp100, в контексте молекул HLA-A*02:01. Применение недавно клонированных A*24:02-ограниченных генов gp100-intron4 TCR может расширить применимость терапии BiTE, нацеленной на gp100, за пределы исключительно HLA-A*02:01-положительных пациентов с раком.

[0182] Способы

[0183] *Образцы клеток*

[0184] Образцы периферической крови были получены от здоровых доноров. Мононуклеарные клетки получали центрифугированием в градиенте плотности (Ficoll-Paque PLUS; GE Healthcare). K562 представляет собой клеточную линию эритролейкоза с нарушенной экспрессией HLA. T2 представляет собой гибридную линию клеток HLA-A*02:01⁺ Т-клеточного лейкоза/В-клеточного лейкоза. Jurkat 76 представляет клеточную линию Т-лимфоцитов лейкоза, в которой отсутствует экспрессия TCR и CD8. Клеточную линию Malme-3М выращивали в среде IMDM с добавлением 20% ФБС и 50 мкг/мл гентамицина (Invitrogen). Линии клеток SK-MEL-28 и A375 выращивали в среде DMEM с добавлением 10% ФБС и 50 мкг/мл гентамицина (Invitrogen). Клеточные линии K562, T2 и Jurkat 76 культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% ФБС и 50 мкг/мл гентамицина. TIL, выделенные из организма пациента с метастатической меланомой, выращивали *in vitro*.

[0185] *Пептиды*

[0186] Синтетические пептиды растворяли до 50 мкг/мл в ДМСО. Используемые пептиды представляли собой A*24:02-ограниченный пептид gp100-intron4 (VYFFLPDHL; SEQ ID NO: 13) и пептид HTLV-1 tax₃₀₁₋₃₀₉ (SFHSLHLLF; SEQ ID NO: 194). Пептид HTLV-1 tax₃₀₁₋₃₀₉ использовали в качестве отрицательного контроля.

[0187] *Гены*

[0188] Ген HLA-A*24:02 конденсировали с усеченной версией рецептора фактора роста нервов человека (Δ NGFR) через внутренний участок посадки рибосомы. Δ NGFR-трансдуцированные клетки выделяли с использованием mAb к NGFR. Полноразмерный ген gp100 был приобретен у компании Dharmacon (Lafayette, CO). Геномная ДНК gp100 была выделена из SK-MEL-28 с помощью мини-набора для выделения геномной ДНК PureLink (Invitrogen). Гены TCR клонировали с помощью ПЦР с быстрой амплификацией 5'-концов кДНК с использованием набора для амплификации кДНК SMARTer RACE (Takara Bio). Продукты 5'-RACE ПЦР клонировали в ретровирусный вектор и секвенировали. Все гены были клонированы в ретровирусный вектор pMX и трансдуцированы с использованием ретровирусной системы на основе клеток 293GPG.

[0189] *Трансфектанты*

[0190] Клетки Jurkat 76/CD8 трансдуцировали отдельными генами TCR α и TCR β . Трансфектанты TCR, полученные из Jurkat 76/CD8, очищали (чистота >95%) с использованием микрогранул CD3 (Miltenyi Biotec). Ранее сообщалось об искусственных APC на основе K562, отдельно экспрессирующих различные гены HLA класса I в качестве единственного аллеля HLA в сочетании с CD80 и CD83 (Butler and Hirano, *Immunol. Rev.*

257:191-209 (2014); Hirano et al., *Clin. Cancer Res.* 12:2967-75 (2006)). Супернатанты ретровируса, полученные из PG13, использовали для трансдукции генов TCR в первичные Т-клетки человека. TransIT293 (Mirus Bio) использовали для трансфекции генов TCR в клеточную линию 293GPG. Клетки Gp100⁻ A375 были ретровирусно трансдуцированы экзонами 1, 2 и 3 и интроном 4 гена gp100 для получения клеток A375/gp100-intron4. Экспрессию трансдуцированного gp100-intron4 оценивали с помощью проточной цитометрии после окрашивания mAb к gp100 (клон 7E3; LifeSpan Biosciences). Клетки HLA-A*24:02⁻ Malme-3M, SK-MEL-28 и A375 ретровирусно трансдуцировали с помощью HLA-A*24:02 с образованием клеток Malme-3M/A*24:02, SK-MEL-28/A*24:02 и A375/A*24:02, соответственно. Ген HLA-A*24:02 был помечен геном ΔNGFR, как описано выше, и клетки ΔNGFR⁺ были очищены (чистота > 95%) и использованы в последующих экспериментах. Только ген ΔNGFR ретровирусно трансдуцировали в качестве контроля.

[0191] *Проточная цитометрия и сортировка клеток*

[0192] Молекулы клеточной поверхности окрашивали конъюгированным с PC5 моноклональным антителом к CD8 (mAb) (клон B9.11; Beckman Coulter), конъюгированным с FITC антителом к NGFR (клон ME20.4; Biolegend) и конъюгированным с APC/Cy7 анти-CD3 (клон UCHT1; Biolegend). Мертвые клетки выделяли с помощью набора LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain (Life Technologies). Для внутриклеточного окрашивания клетки фиксировали и пермеабилizировали с использованием набора Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences). Окрашенные клетки анализировали с помощью проточной цитометрии (BD Biosciences), а анализ данных выполняли с помощью FlowJo (Tree Star). Сортировку клеток проводили с использованием FACS Aria II (BD Bioscience).

[0193] *Анализ цитокинов ELISPOT*

[0194] Были проведены анализы ELISPOT для определения уровней IFN-γ. Планшеты PVDF (Millipore, Bedford, MA) покрывали захватывающими mAb (1-D1K; MABTECH, Mariemont, OH), и Т-клетки инкубировали с 2×10^4 клеток-мишеней на лунку в присутствии или в отсутствие пептида в течение 20–24 часов при температуре 37°C. Затем планшеты промывали и инкубировали с конъюгированными с биотином детектирующими mAb (7-B6-1; MABTECH). Затем добавляли SA, конъюгированный с HRP (Jackson ImmunoResearch), и появлялись пятна IFN-γ. Реакцию останавливали, тщательно промывая холодной водопроводной водой. Планшеты ELISPOT сканировали и подсчитывали с использованием устройства для считывания планшетов ImmunoSpot и программного обеспечения ImmunoSpot версии 5.0 (Cellular Technology Limited, Shaker Heights, OH).

[0195] *Размножение CD8⁺ TIL HLA-ограниченным специфичным для пептидов*

образом

[0196] CD8⁺ ТП очищали посредством отрицательной магнитной селекции с использованием набора для выделения CD8⁺ Т-клеток (Miltenyi Biotec). В А*24:02-искусственные APC вводили 10 мкг/мл пептида gp100-intron4 в течение 6 часов. Затем искусственные APC облучали при 200 Гр, промывали и добавляли к ТП при соотношении эффектор/мишень (Е:Т) 20:1. Начиная со следующего дня, каждые три дня к культурам добавляли 10 МЕ/мл IL-2 (Novartis), 10 нг/мл IL-15 (Peprotech) и 30 нг/мл IL-21 (Peprotech).

[0197] *Размножение первичных CD8⁺ Т-клеток, трансдуцированных клонированным TCR*

[0198] CD3⁺ Т-клетки очищали посредством отрицательной магнитной селекции с использованием набора для выделения пан-Т-клеток (Miltenyi Biotec). Очищенные Т-клетки стимулировали искусственным APC/mОКТ3, облученным 200 Гр при соотношении Е:Т 20:1. Начиная со следующего дня, активированные Т-клетки ретровирусно трансдуцировали клонированными генами TCR посредством центрифугирования в течение 1 часа при 1000 g при температуре 32°C в течение 3 дней подряд. На следующий день к Т-клеткам, трансдуцированным TCR, добавляли 100 МЕ/мл IL-2 и 10 нг/мл IL-15. Питательную среду пополняли каждые 2-3 дня.

[0199] *Получение мультимеров рHLA на основе клеток человека*

[0200] Ген HLA класса I с созревшей аффинностью был сконструирован с возможностью нести остаток Glu (E) вместо остатка Gln (Q) в положении 115 домена α2 и домен α3, полученный из гена K^b мыши, вместо домена α3 HLA класса I. Путем слияния внеклеточного домена гена HLA класса I с созревшей аффинностью с гибким линкером Gly-Ser (GS), за которым следует 6х His-метка, мы получили растворимый ген Q^{115E}-K^b HLA класса I. Клетки HEK293T индивидуально трансдуцировали различными растворимыми генами Q^{115E}-K^b HLA класса I вместе с геном β2m с использованием ретровирусной системы на основе клеток 293GPG. Стабильные клетки HEK293T, эктопически экспрессирующие растворимый Q^{115E}-K^b класса I с созревшей аффинностью, выращивали до конфлюэнтности, а затем среду меняли. Через 48 часов кондиционированную среду собирали и сразу использовали или замораживали до использования. Супернатант, содержащий растворимый Q^{115E}-K^b HLA класса I, продуцируемый трансфектантами HEK293T, смешивали со 100-1000 мкг/мл представляющего интерес пептида, ограниченного классом I, в течение ночи при температуре 37°C для пептидного обмена *in vitro*. Растворимый мономерный Q^{115E}-K^b класса I, нагруженный пептидом, был димеризован с использованием анти-His mAb (клон AD1.1.10; Abcam), конъюгированного с флуорохромом, таким как фикоэритрин (PE), в молярном соотношении 2:1 в течение 2 часов при комнатной

температуре или в течение ночи при температуре 4°C. Концентрацию функционально растворимых молекул Q115E -K^b HLA класса I измеряли с помощью специфического ELISA с использованием mAb к пан класса I (клон W6/32, собственного производства) и биотинилированного mAb к His-метке (клон AD1.1.10, R&D systems) в качестве захватывающих и детектирующих антител, соответственно.

[0201] *Окрашивание мультимером pHLA*

[0202] Т-клетки (1×10^5) инкубировали в течение 30 минут при температуре 37°C в присутствии 50 нМ дазатиниба (LC laboratories). Затем клетки промывали и инкубировали с 5-10 мкг/мл мультимера в течение 30 минут при комнатной температуре и добавляли фрагмент AffiniPure Fab, конъюгированный R-фикоэритрином, козьего антимышиного IgG1 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) в течение 15 минут при температуре 4°C. Затем клетки промывали три раза и обрабатывали mAb к CD8 в течение 15 минут при температуре 4°C. Наконец, мертвые клетки были выделены с помощью набора LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain.

[0203] *Статистический анализ*

[0204] Статистический анализ проводили с использованием GraphPad Prism 5.0e. Для определения того, существенно ли различались две группы по заданной переменной, мы провели анализ с помощью t-критерия Уэлча (двустороннего). Значения $P < 0,05$ считались значимыми.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая (i) первую нуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR) или его антигенсвязывающую часть, которая специфически связывает человеческий gp100 («анти-gp100 TCR»); и (ii) вторую нуклеотидную последовательность, причем вторая нуклеотидная последовательность или полипептид, кодируемый второй нуклеотидной последовательностью, ингибирует экспрессию эндогенного TCR,

причем анти-gp100 TCR конкурирует за связывание с человеческим gp100 с эталонным TCR, который содержит альфа-цепь и бета-цепь, при этом альфа-цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, а бета-цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

2. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая (i) первую нуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR) или его антигенсвязывающую часть, которая специфически связывает человеческий gp100 («анти-gp100 TCR»); и (ii) вторую нуклеотидную последовательность, причем вторая нуклеотидная последовательность или полипептид, кодируемый второй нуклеотидной последовательностью, ингибирует экспрессию эндогенного TCR,

причем анти-gp100 TCR связывает тот же эпитоп или перекрывающийся эпитоп человеческого gp100, что и эталонный TCR, который содержит альфа-цепь и бета-цепь, при этом альфа-цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, а бета-цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

3. Молекула нуклеиновой кислоты по пп. 1 или 2, в которой анти-gp100 TCR связывается с эпитопом gp100, состоящим из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 13.

4. Молекула нуклеиновой кислоты по пп. 2 или 3, в которой эпитоп связан с молекулой HLA класса I.

5. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 4, причем молекула HLA класса I представляет собой аллель HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F или HLA-G.

6. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 4, причем молекула HLA класса I представляет собой аллель HLA-A*24.

7. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 4-6, причем молекула HLA класса I выбрана из аллеля HLA-A*24:01, аллеля HLA-A*24:02 и аллеля HLA-A*24:03.

8. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 4-7, причем молекула HLA класса I представляет собой аллель HLA-A*24:01.

9. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-8, в которой анти-gp100 TCR содержит альфа-цепь и бета-цепь,

причем альфа-цепь содержит переменную область, содержащую CDR1 альфа-цепи, CDR2 альфа-цепи и CDR3 альфа-цепи; и

причем бета-цепь содержит переменный домен, содержащий CDR1 бета-цепи, CDR2 бета-цепи и CDR3 бета-цепи;

при этом CDR3 альфа-цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7.

10. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 9, в которой CDR3 бета-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10.

11. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-8, в которой анти-gp100 TCR содержит альфа-цепь и бета-цепь, причем альфа-цепь содержит переменную область, содержащую CDR1 альфа-цепи, CDR2 альфа-цепи и CDR3 альфа-цепи; и

причем бета-цепь содержит переменный домен, содержащий CDR1 бета-цепи, CDR2 бета-цепи и CDR3 бета-цепи;

при этом CDR3 бета-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10.

12. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 11, в которой CDR3 альфа-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7.

13. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 9-12, в которой CDR1 альфа-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5.

14. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 9-13, в которой CDR1 бета-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID

NO: 8.

15. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 9-14, в которой CDR2 альфа-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6.

16. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 9-15, в которой CDR2 бета-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9.

17. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 9-16, в которой переменный домен альфа-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность переменного домена, присутствующего в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1.

18. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 9-17, в которой переменный домен бета-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность переменного домена, присутствующего в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2.

19. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 9-18, в которой альфа-цепь анти-gp100 TCR дополнительно содержит константную область, причем константная область отличается от эндогенной константной области альфа-цепи.

20. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 9-19, в которой альфа-цепь анти-gp100 TCR дополнительно содержит константную область, причем константная область альфа-цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с константной областью, присутствующей в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1.

21. Молекула нуклеиновой кислоты по пп. 19 или 20, в которой константная область альфа-цепи содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5 аминокислотных замен относительно константной области, присутствующей в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1.

22. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 9-21, в которой бета-цепь анти-gp100 TCR дополнительно содержит константную область, причем константная область отличается от эндогенных константных областей бета-цепи.
23. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 9-22, в которой бета-цепь анти-gp100 TCR дополнительно содержит константную область, причем константная область бета-цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с константной областью, присутствующей в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2.
24. Молекула нуклеиновой кислоты по пп. 22 или 23, в которой константная область бета-цепи содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5 аминокислотных замен относительно константной области, присутствующей в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2.
25. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 9-24, в которой альфа-цепь анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1.
26. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 9-25, в которой бета-цепь анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.
27. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-26, в которой вторая нуклеотидная последовательность представляет собой одну или более миРНК, которые снижают экспрессию эндогенных TCR.
28. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 27, в которой одна или более миРНК являются комплементарными целевой последовательности в нуклеотидной последовательности, кодирующей константную область эндогенных TCR.
29. Молекула нуклеиновой кислоты по пп. 27 или 28, в котором одна или более миРНК содержат аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 53-56.

30. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-29, в которой вторая нуклеотидная последовательность кодирует Cas9.
31. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-30, в которой анти-gp100 TCR содержит константную область альфа-цепи, константную область бета-цепи или обе; и причем константная область альфа-цепи, константная область бета-цепи или обе содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5 замен в целевой последовательности относительно соответствующей аминокислотной последовательности эндогенного TCR.
32. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-31.
33. Вектор по п. 32, причем вектор представляет собой вирусный вектор, вектор млекопитающих или бактериальный вектор.
34. Вектор по пп. 32 или 33, причем вектор представляет собой ретровирусный вектор.
35. Вектор по любому из пп. 32-34, причем вектор выбран из группы, состоящей из аденовирусного вектора, лентивируса, вектора вируса Сендай, бакуловирусного вектора, вектора вируса Эпштейна — Барра, паповавирусного вектора, вектора вируса осповакцины, вектора вируса простого герпеса, гибридного вектора и вектора аденоассоциированного вируса (AAV).
36. Вектор по любому из пп. 32-35, причем вектор представляет собой лентивирус.
37. Т-клеточный рецептор (TCR) или его антигенсвязывающая часть, включающая переменный домен альфа-цепи анти-gp100 TCR по любому из пп. 9-31 и переменный домен бета-цепи анти-gp100 TCR по любому из пп. 9-31.
38. Рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR) или его антигенсвязывающая часть, специфически связывающая человеческий gp100 («анти-gp100 TCR»), который конкурирует за связывание с человеческим gp100 с эталонным TCR;

причем эталонный TCR содержит альфа-цепь и бета-цепь, причем альфа-цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, а бета-цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2; и

причем анти-gp100 TCR содержит альфа-цепь и бета-цепь, причем альфа-цепь

содержит константную область и при этом бета-цепь содержит константную область; причем

(i) константная область альфа-цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5 аминокислотных замен относительно константной области, присутствующей в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1 или

(ii) константная область бета-цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5 аминокислотных замен относительно константной области, присутствующей в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2.

39. Рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR) или его антигенсвязывающая часть, специфически связывающая человеческий gp100 («анти-gp100 TCR»), который связывает тот же эпитоп или перекрывающийся эпитоп человеческого gp100, что и эталонный TCR;

причем эталонный TCR содержит альфа-цепь и бета-цепь, причем альфа-цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, а бета-цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2;

причем анти-gp100 TCR содержит альфа-цепь и бета-цепь, причем альфа-цепь содержит константную область и при этом бета-цепь содержит константную область; причем

(i) константная область альфа-цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5 аминокислотных замен относительно константной области, присутствующей в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1 или

(ii) константная область бета-цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5 аминокислотных замен относительно константной области, присутствующей в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2.

40. Анти-gp100 TCR по пп. 38 или 39, который связывается с эпитопом gp100,

состоящим из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 13.

41. Анти-gp100 TCR по пп. 39 или 40, в котором эпитоп объединен в комплекс с молекулой HLA класса I.

42. Анти-gp100 TCR по п. 41, в котором молекула HLA класса I представляет собой аллель HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F или HLA-G.

43. Анти-gp100 TCR по пп. 41 или 42, в котором молекула HLA класса I представляет собой аллель HLA-A*24.

44. Анти-gp100 TCR по любому из пп. 41-43, в котором молекула HLA класса I выбрана из аллеля HLA-A*24:01, аллеля HLA-A*24:02 и аллеля HLA-A*24:03.

45. Анти-gp100 TCR по любому из пп. 41-44, в котором молекула HLA класса I представляет собой аллель HLA-A*24:02.

46. Анти-gp100 TCR по любому из пп. 38-45, причем альфа-цепь анти-gp100 TCR содержит переменный домен, содержащий CDR1 альфа-цепи, CDR2 альфа-цепи и CDR3 альфа-цепи; и

причем бета-цепь анти-gp100 TCR содержит переменный домен, содержащий CDR1 бета-цепи, CDR2 бета-цепи и CDR3 бета-цепи;

причем CDR3 альфа-цепи анти-gp100 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7.

47. Анти-gp100 TCR по п. 46, причем CDR3 бета-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10.

48. Анти-gp100 TCR по любому из пп. 38-45, причем альфа-цепь анти-gp100 TCR содержит переменный домен, содержащий CDR1 альфа-цепи, CDR2 альфа-цепи и CDR3 альфа-цепи; и

причем бета-цепь анти-gp100 TCR содержит переменный домен, содержащий CDR1 бета-цепи, CDR2 бета-цепи и CDR3 бета-цепи;

при этом CDR3 бета-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10.

49. Анти-gp100 TCR по п. 48, причем CDR3 альфа-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7.
50. Анти-gp100 TCR по п. 49, причем CDR1 альфа-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5.
51. Анти-gp100 TCR по любому из пп. 46-50, в котором CDR1 бета-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8.
52. Анти-gp100 TCR по любому из пп. 46-51, в котором CDR2 альфа-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6.
53. Анти-gp100 TCR по любому из пп. 46-52, в котором CDR2 бета-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9.
54. Анти-gp100 TCR по любому из пп. 46-53, в котором переменный домен альфа-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность переменного домена, присутствующего в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1.
55. Анти-gp100 TCR по любому из пп. 46-54, в котором переменный домен бета-цепи анти-gp100 TCR содержит аминокислотную последовательность переменного домена, присутствующего в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2.
56. Анти-gp100 TCR по любому из пп. 38-55, в котором константная область альфа-цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности аминокислотной последовательности константной области, присутствующей в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1.
57. Анти-gp100 TCR по любому из пп. 38-56, в котором константная область бета-цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности с аминокислотной последовательностью константной области, присутствующей в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2.
58. Анти-gp100 TCR по любому из пп. 38-57, в котором альфа-цепь анти-gp100 TCR

содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1.

59. Анти-grp100 TCR по любому из пп. 38-58, в котором бета-цепь анти-grp100 TCR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

60. Биспецифический TCR, содержащий первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен, причем первый антигенсвязывающий домен содержит TCR или его антигенсвязывающую часть по п. 37 или TCR, или его антигенсвязывающую часть по любому из пп. 38-59.

61. Биспецифический TCR по п. 60, в котором первый антигенсвязывающий домен содержит одноцепочечный переменный фрагмент («scFv»).

62. Биспецифический TCR по пп. 60 или 61, в котором второй антигенсвязывающий домен специфически связывается с белком, экспрессированным на поверхности Т-клетки.

63. Биспецифический TCR по любому из пп. 60-62, в котором второй антигенсвязывающий домен специфически связывается с CD3.

64. Биспецифический TCR по любому из пп. 60-63, в котором второй антигенсвязывающий домен содержит scFv.

65. Биспецифический TCR по любому из пп. 60-64, в котором первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен связаны или ассоциированы ковалентной связью.

66. Биспецифический TCR по любому из пп. 60-65, в котором первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен связаны пептидной связью.

67. Клетка, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-31, вектор по любому из пп. 32-36, TCR по п. 37, рекомбинантный TCR по любому из пп. 38-59 или биспецифический TCR по любому из пп. 60-66.

68. Клетка по п. 67, которая дополнительно экспрессирует CD3.

69. Клетка по пп. 67 или 68, которая выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, естественной киллерной (NK) клетки, естественной киллерной Т-клетки (NKT) или клетки ИЛС.

70. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту клетки по любому из пп. 67–69.

71. Способ по п. 70, в котором рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака костей, рака поджелудочной железы, рака кожи, рака головы или шеи, рака матки, рака яичников, рака прямой кишки, рака анальной области, рака желудка, рака яичек, рака матки, карциномы фаллопиевых труб, карциномы эндометрия, карциномы шейки матки, карциномы влагалища, карцинома вульвы, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы (НХЛ), первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомы (ПМВКЛ), диффузной В-крупноклеточной лимфомы (ДВККЛ), фолликулярной лимфомы (ФЛ), трансформированной фолликулярной лимфомы, лимфомы маргинальной зоны селезенки (ЛМЗС), рака пищевода, рака тонкой кишки, рака эндокринной системы, рака щитовидной железы, рака паращитовидной железы, рака надпочечников, саркомы мягких тканей, рака уретры, рака полового члена, хронического или острого лейкоза, острого миелоидного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) (включая не Т-клеточный ОЛЛ), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), солидных опухолей детского возраста, лимфоцитарной лимфомы, рака мочевого пузыря, рака почки или мочеточника, карцинома почечной лоханки, новообразования центральной нервной системы (ЦНС), первичной лимфомы ЦНС, опухолевого ангиогенеза, опухоли оси позвоночника, глиомы ствола головного мозга, аденомы гипофиза, саркомы Капоши, эпидермоидного рака, плоскоклеточного рака, Т-клеточной лимфомы, виды рака, индуцированные окружающей средой, включая рак, индуцированный асбестом, другие В-клеточные злокачественные опухоли, а также комбинации указанных видов рака.

72. Способ по пп. 70 или 71, в котором рак является рецидивирующим или рефрактерным.

73. Способ по любому из пп. 70–72, в котором рак является локально-распространенным.

74. Способ по любому из пп. 70–73, в котором рак является распространенным.

75. Способ по любому из пп. 70–74, в котором рак является метастатическим.

76. Способ по любому из пп. 70–75, в котором клетки получают от субъекта.

77. Способ по любому из пп. 70–76, в котором клетки получают от донора, отличного от субъекта.

78. Способ по любому из пп. 70-77, в котором субъект подвергается предварительному кондиционированию перед введением клеток.
79. Способ по любому из пп. 68-78, в котором предварительное кондиционирование включает введение субъекту химиотерапии, цитокина, белка, малой молекулы или любой их комбинации.
80. Способ по пп. 78 или 79, в котором предварительное кондиционирование включает введение субъекту интерлейкина.
81. Способ по любому из пп. 78-80, в котором предварительное кондиционирование включает введение IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21 или любой их комбинации.
82. Способ по любому из пп. 78-81, в котором предварительное кондиционирование включает введение прекондиционирующего средства, выбранного из группы, состоящей из циклофосфида, флударабина, витамина C, ингибитора АКТ, АТРА, рапамицина или любой их комбинации.
83. Способ по любому из пп. 78-82, в котором предварительное кондиционирование включает введение циклофосфида, флударабина или обоих препаратов.
84. Способ конструирования антиген-нацеливающей клетки, включающий трансдукцию клетки, собранной у субъекта, нуждающегося в Т-клеточной терапии, молекулой нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-31 или вектором по любому из пп. 32-36.
85. Способ по п. 84, в котором антиген-нацеливающая клетка дополнительно экспрессирует CD3.
86. Способ по пп. 84 или 85, в котором клетка представляет собой Т-клетку или естественную киллерную (NK) клетку.
87. Молекула HLA класса I объединена в комплекс с пептидом, причем молекула HLA класса I содержит домен $\alpha 1$, домен $\alpha 2$, домен $\alpha 3$ и домен $\beta 2m$, а пептид состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14.
88. Молекула HLA класса I по п. 87, причем молекула представляет собой HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F или HLA-G.
89. Молекула HLA класса I по пп. 87 или 88, причем молекула представляет собой HLA-

A.

90. Молекула HLA класса I по любому из пп. 87-89, представляющая собой аллель HLA-A*24.
91. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 87-90, причем молекула HLA класса I выбрана из аллеля HLA-A*24:01, аллеля HLA-A*24:02 и аллеля HLA-A*24:03.
92. Молекула HLA класса I по любому из пп. 87-91, причем молекула HLA класса I представляет собой аллель HLA-A*24:01.
93. Молекула HLA класса I по любому из пп. 87-92, причем молекула HLA класса I представляет собой аллель HLA-A*24:02.
94. Молекула HLA класса I по любому из пп. 87-93, представляющая собой мономер.
95. Молекула HLA класса I по любому из пп. 87-93, представляющая собой димер.
96. Молекула HLA класса I по любому из пп. 87-93, представляющая собой тример.
97. Молекула HLA класса I по любому из пп. 87-93, представляющая собой тетрамер.
98. Молекула HLA класса I по любому из пп. 87-93, представляющая собой пентамер.
99. Антигенпрезентирующая клетка (APC), включающая молекулу HLA класса I по любому из пп. 87-98.
100. APC по п. 99, в которой молекула HLA класса I экспрессируется на поверхности APC.
101. Способ обогащения целевой популяции Т-клеток, полученных от человека, включающий приведение Т-клеток в контакт с молекулой HLA класса I по любому из пп. 87-98 или APC по пп. 99 или 100, причем после приведения в контакт обогащенная популяция Т-клеток содержит большее количество Т-клеток, способных связывать молекулу HLA класса I, по сравнению с количеством Т-клеток, способных связывать молекулу HLA класса I до приведения в контакт.
102. Способ обогащения целевой популяции Т-клеток, полученных от субъекта-человека, включающий приведение Т-клеток *in vitro* в контакт с пептидом, причем пептид состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 13, причем

после приведения в контакт обогащенная популяция Т-клеток содержит большее количество Т-клеток, способных нацеливаться на опухолевую клетку, по сравнению с количеством Т-клеток, способных нацеливаться на опухолевую клетку до приведения в контакт.

103. Способ по пп. 101 или 102, в котором Т-клетки, полученные от субъекта-человека, являются инфильтрирующими опухоль лимфоцитами (TIL).

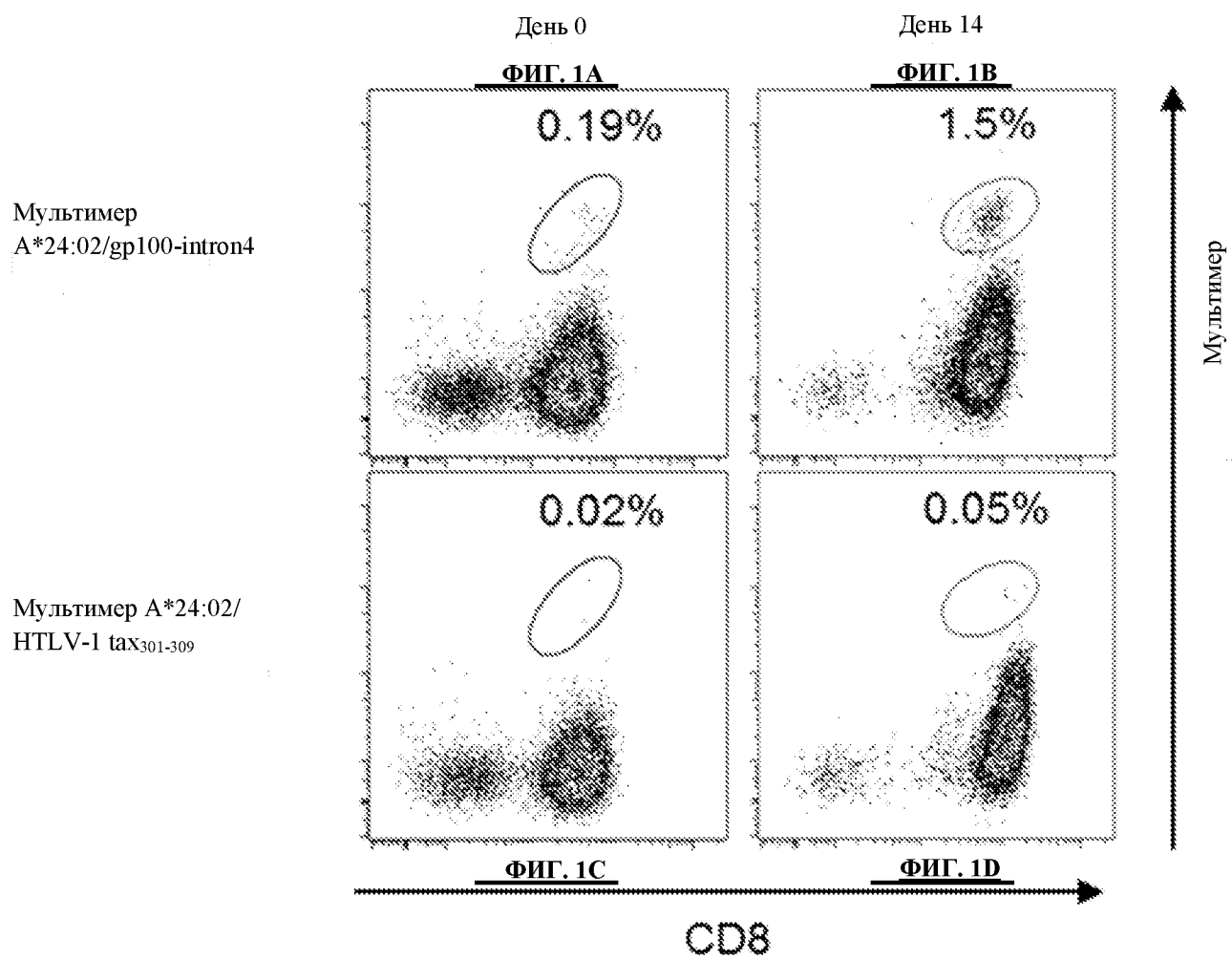
104. Способ лечения опухоли у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту обогащенных Т-клеток по пп. 101 или 102.

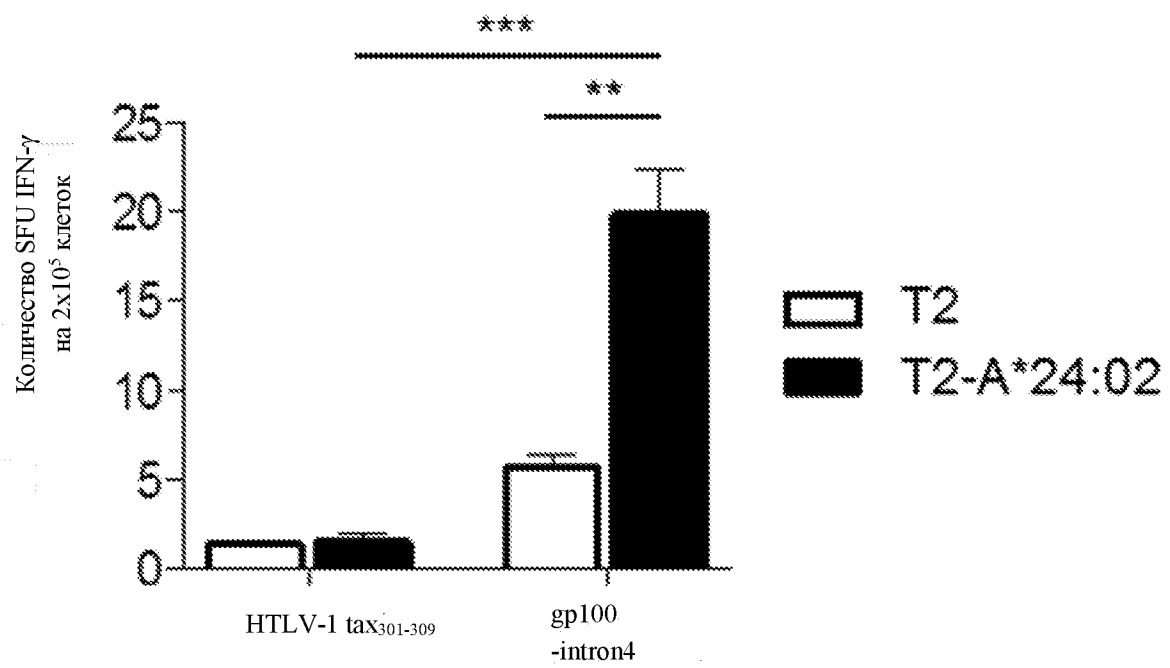
105. Способ усиления опосредованного цитотоксическими Т-клетками нацеливания на раковые клетки у субъекта, страдающего раком, включающий введение субъекту пептида, имеющего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13.

106. Противораковая вакцина, содержащая пептид, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13.

107. Способ отбора Т-клеток, способных нацеливаться на опухолевую клетку, включающий приведение популяции выделенных Т-клеток *in vitro* в контакт с пептидом, причем пептид состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 11.

108. Способ по п. 107, в котором Т-клетка представляет собой инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL).

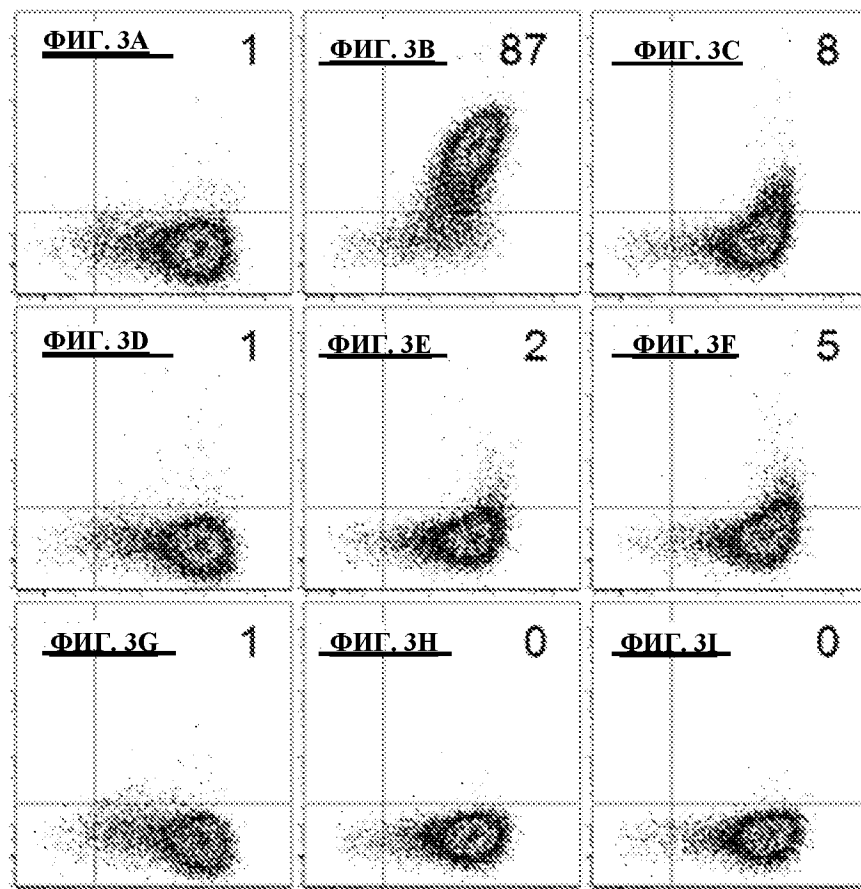


ФИГ. 2

Jurkat76/CD8

трансдуцированный с помощью

Нет

A*24:02/ gp100-intron4
TCRA*24:02/
MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁
TCR (MA24)Мультимер A*24:02/
gp100-intron4A*24:02/
Мультимер HTLV-1 tax₃₀₁₋₃₀₉A*24:02/ неизменный
мультимер

CD8

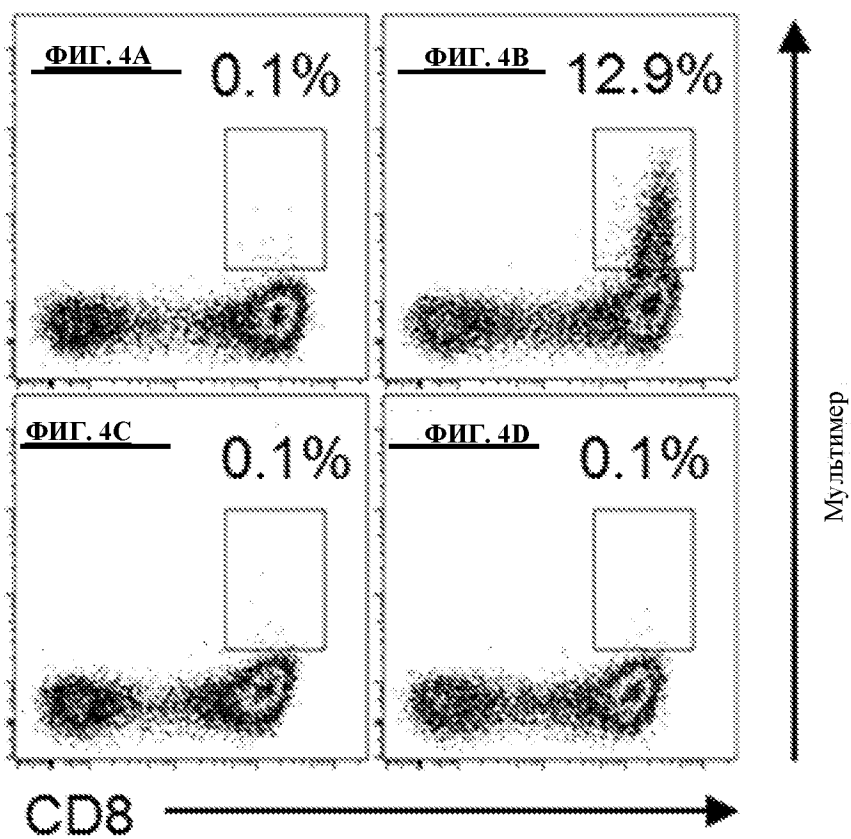
Трансдуцированный с помощью

Нет

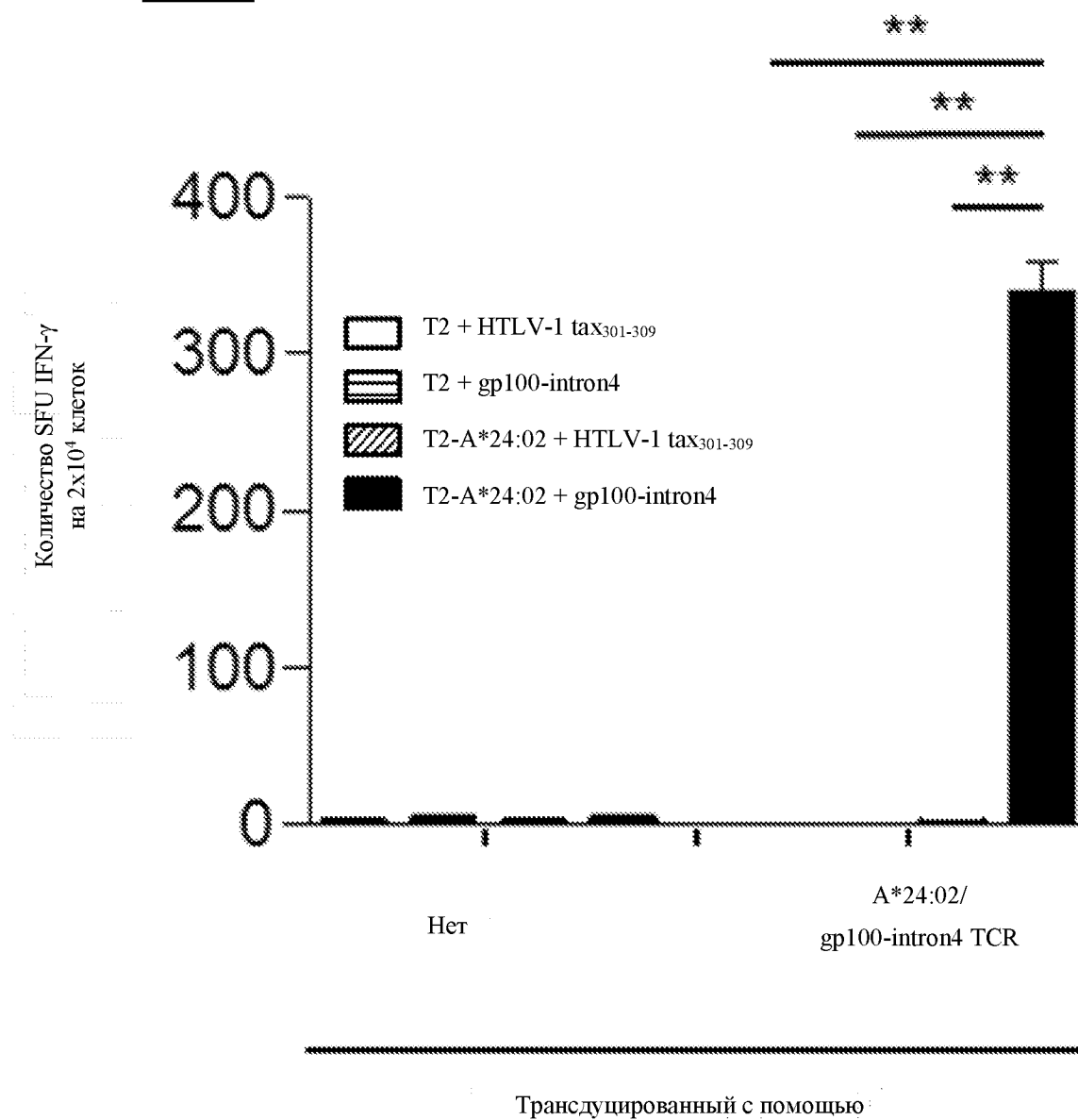
A*24:02/ gp100-intron4 TCR

Мультимер A*24:02/ gp100-intron4

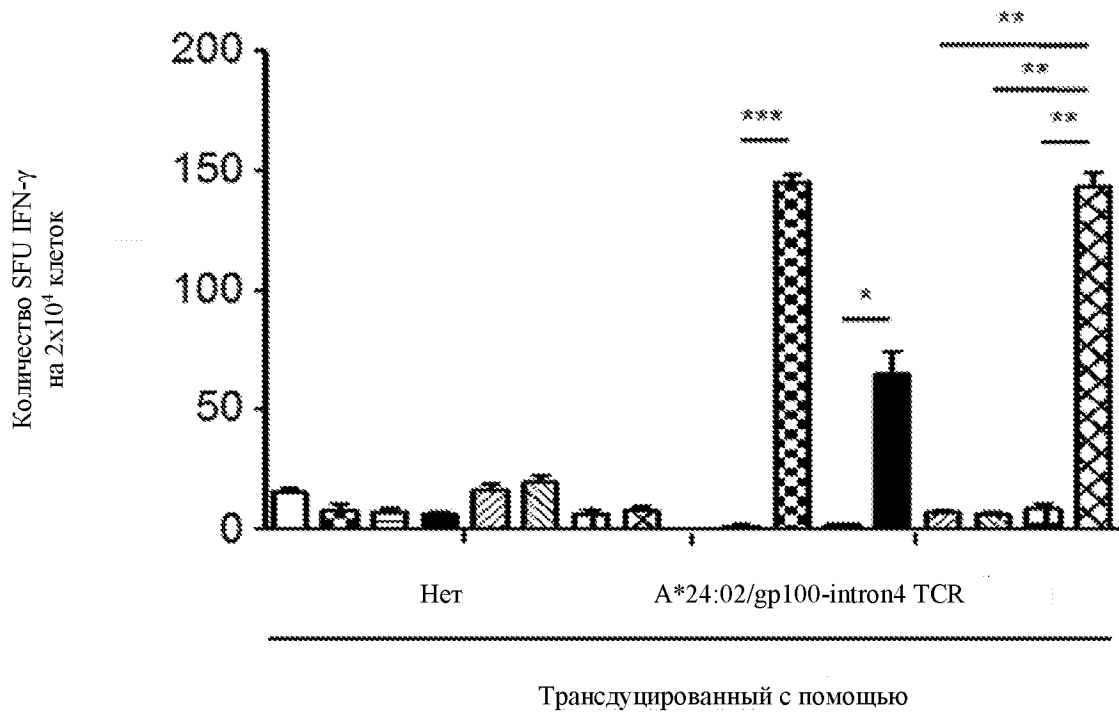
A*24:02/
Мультимер HTLV-1 tax₃₀₁₋₃₀₉



ФИГ. 5



ФИГ. 6А

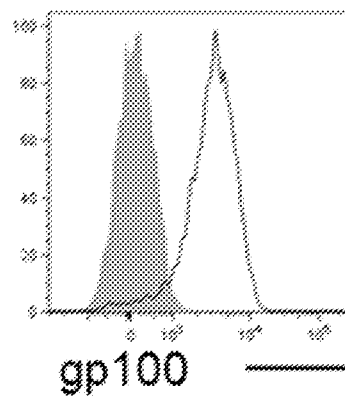


ФИГ. 6В

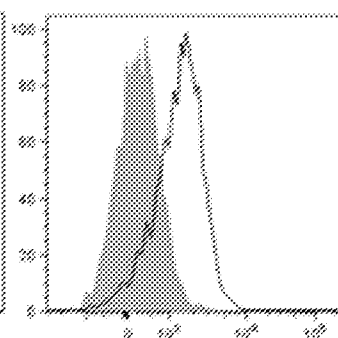
	A*24:02	gp100-intron4
Malme-3M	-	+
Malme-3M/A*24:02	+	+
SK-MEL-28	-	+
SK-MEL-28/A*24:02	+	+
A375	-	-
A375/A*24:02	+	-
A375/gp100-intron4	-	+
A375/A*24:02/gp100-intron4	+	+

ФИГ. 7А

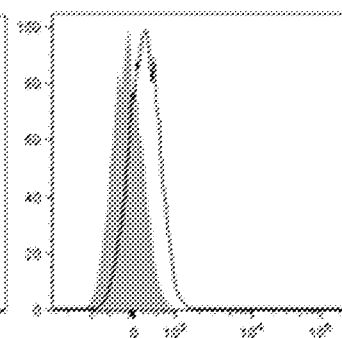
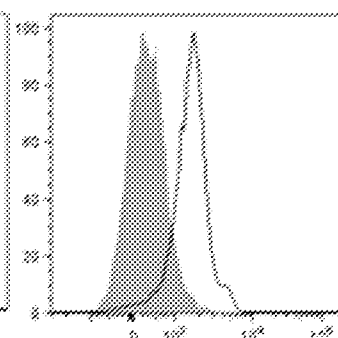
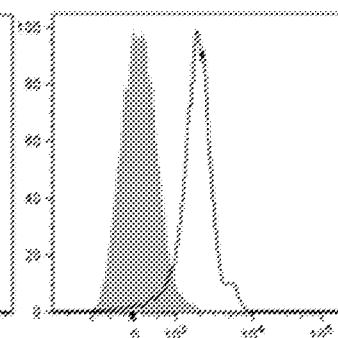
Malme-3M

ФИГ. 7В

SK-MEL-28

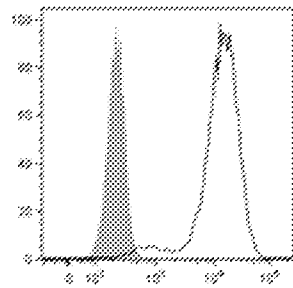
ФИГ. 7С

A375

ФИГ. 7DA375/
gp100-intron4ФИГ. 7ЕA375/A*24:02/
gp100-intron4

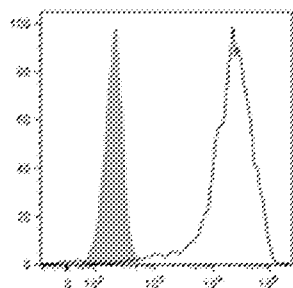
ФИГ. 8А

Malme-3M



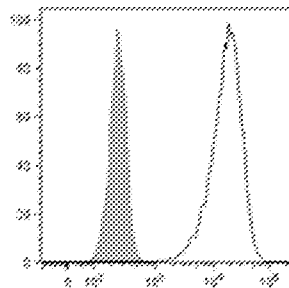
ФИГ. 8В

Malme-3M/
A*24:02



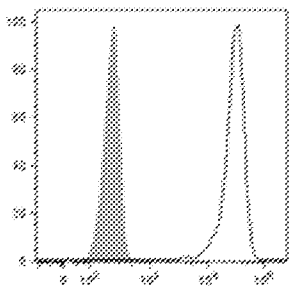
ФИГ. 8С

SK-MEL-28



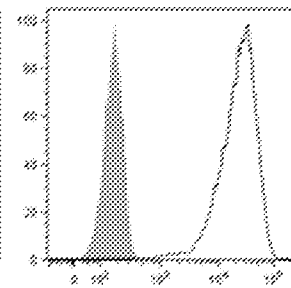
ФИГ. 8D

SK-MEL-28/
A*24:02



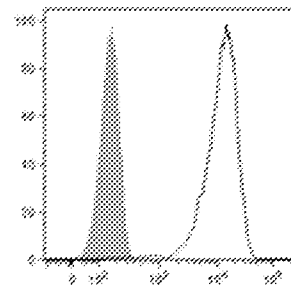
ФИГ. 8Е

A375



ФИГ. 8F

A375/
A*24:02



8/8

$\Delta NGFR$

