

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202091276 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.09.04

(51) Int. Cl. C07K 14/47 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.11.16

(54) НОВЫЙ ГАММА ДЕЛЬТА Т-КЛЕТОЧНЫЙ РЕЦЕПТОР И ЕГО ЛИГАНД

(31) 1719169.3

(72) Изобретатель:

(32) 2017.11.20

Сьюэлл Эндрю, Долтон Гарри (GB)

(33) GB

(86) PCT/GB2018/053321

(74) Представитель:

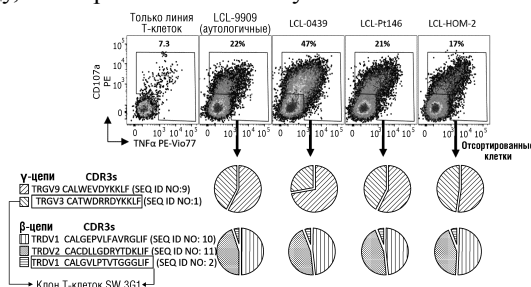
(87) WO 2019/097244 2019.05.23

Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

ЮНИВЕРСИТИ КОЛЛИДЖ
КАРДИФФ КОНСАЛТЕНТС ЛТД
(GB)

(57) Настоящее изобретение относится к новому Т-клеточному рецептору (TCR), в частности, по крайней мере одному из его определяющих комплементарных участков (CDR); Т-клетке, экспрессирующей указанный TCR; клону, экспрессирующему указанный TCR; вектору, кодирующему указанный TCR; растворимому варианту указанного TCR; фармацевтической композиции, или иммуногенному агенту, или биспецифическому средству, или вакцине, содержащей указанный TCR, указанную клетку, указанный клон или указанный вектор; указанному TCR, или указанной клетке, или указанному клону, или указанному вектору, или указанной фармацевтической композиции, или иммуногенному агенту, или биспецифическому средству, или вакцине для применения для лечения рака; способу лечения рака с использованием указанного TCR, указанной клетки, указанного клона, указанного вектора, указанной фармацевтической композиции, иммуногенного агента, биспецифического средства или вакцины, содержащей указанный TCR, и лиганду, с которым связывается указанный TCR.



A1

202091276

202091276

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-562359EA/011

НОВЫЙ ГАММА ДЕЛЬТА Т-КЛЕТОЧНЫЙ РЕЦЕПТОР И ЕГО ЛИГАНД

Область техники

Настоящее изобретение относится к новому Т-клеточному рецептору (TCR), в частности, по крайней мере одному из его определяющих комплементарность участков (CDR); Т-клетке, экспрессирующей указанный TCR; клону, экспрессирующему указанный TCR; вектору, кодирующему указанный TCR; растворимому варианту указанного TCR; фармацевтической композиции, или иммуногенному агенту, или биспецифическому средству, или вакцине, содержащей указанный TCR, указанную клетку, указанный клон или указанный вектор; применению указанного TCR, или указанной клетки, или указанного клона, или указанного вектора, или указанной фармацевтической композиции, или иммуногенного агента, или биспецифического средства, или вакцины для лечения рака; способу лечения рака с использованием указанного TCR, указанной клетки, указанного клона, указанного вектора, указанной фармацевтической композиции, иммуногенного агента, биспецифического средства или вакцины, содержащей указанный TCR, и лиганду, с которым связывается указанный TCR.

Предпосылки создания изобретения

Авторы настоящего изобретения открыли новый класс $\gamma\delta$ Т-клеток, эффективный для лечения рака, для распознавания которым клетки-мишени требуется, чтобы она экспрессировала интактный ген SCNN1A. Эта Т-клетка не соответствует соглашению о необходимости специфического антигена лейкоцитов человека (HLA) для распознавания мишени и поэтому считается «нетрадиционной». Лocus HLA сильно варьирует, и на сегодняшний день было описано более 17000 различных аллелей. Поэтому любой терапевтический подход, который работает через HLA, может быть эффективен только у меньшинства пациентов. Напротив, вся популяция людей экспрессирует SCNN1A, ген, необходимый для распознавания раковых клеток через открытый авторами настоящего изобретения $\gamma\delta$ TCR и соответствующий ему новый клон Т-клеток, который в дальнейшем обозначается как SW.3G1. Этот клон был открыт во время скрининга $\gamma\delta$ Т-клеток, которые могли распознавать лимфобластоидные клеточные линии (LCL), созданные путем инфицирования здоровых В-клеток вирусом Эпштейна-Барра (EBV), также называемым вирусом герпеса человека 4 (HHV-4). Преимущественно, $\gamma\delta$ Т-клеточный клон SW.3G1 не реагирует на здоровые В-клетки или другие линии здоровых клеток.

Дальнейшие исследования показали, что $\gamma\delta$ Т-клеточный клон SW.3G1 может распознавать большинство, если не все, раковые клетки. Ген SCNN1A необходим для этого распознавания, а значит, является лигандом, связывающимся с TCR SW.3G1.

Как известно и показано на фиг. 2, TCR представляет собой связанный дисульфидными связями, закрепленный в мембране гетеродимерный белок, обычно состоящий из сильно варьируемых гамма- и дельта-цепей, которые связываются с инвариантными молекулами CD3-цепи с образованием полностью функционирующего

TCR. Т-клетки, экспрессирующие этот рецептор, называют $\gamma:\delta$ (или $\gamma\delta$) Т-клетками.

γ - и δ -цепи состоят из экстраклеточных доменов, содержащих константную (С) область и переменную (V) область. Константная область является проксимальной к клеточной мембране, за ней следуют трансмембранная область и короткий цитоплазматический хвост, в то время как переменная область связывается с лигандом. Лиганд для большинства $\gamma\delta$ Т-клеток остается неизвестным.

Каждый переменный домен и γ -цепи, и δ -цепи TCR имеет три переменных участка, называемых определяющими комплементарность участками (CDR). Как правило, антигенсвязывающий сайт образован петлями CDR γ -цепи и δ -цепи TCR. CDR1 γ и CDR2 γ кодируются отдельными генами V γ , тогда как CDR1 δ и CDR2 $\gamma\delta$ кодируются отдельными генами V δ . CDR3 γ -цепи TCR является гиперпеременной из-за возможности добавления и удаления нуклеотидов вокруг места соединения V-области и соединительной области (J-области). CDR3 δ -цепи TCR обладает еще большей способностью к вариации, поскольку он также может включать ген разнообразия (D) после того, как произошла рекомбинация VDJ.

В 2015 году приблизительно 90,5 миллионов человек страдали раком. Приблизительно 14,1 миллиона новых случаев происходят в год (не считая рака кожи, кроме меланомы). Он приводит к приблизительно 8,8 миллионам смертей (15,7%) людей. Самыми распространенными типами рака у мужчин являются рак легкого, рак предстательной железы, колоректальный рак и рак желудка. У женщин самыми распространенными типами рака являются рак молочной железы, колоректальный рак, рак легкого и рак шейки матки. Если бы рак кожи, кроме меланомы, был включен в общее число новых случаев заболевания раком в год, он бы составил приблизительно 40% случаев. У детей самыми распространенными являются острый лимфобластный лейкоз и опухоли головного мозга, за исключением Африки, где неходжкинская лимфома встречается чаще. В 2012 году у приблизительно 165000 детей в возрасте до 15 лет был диагностирован рак. Риск рака значительно возрастает с возрастом, и многие раки встречаются чаще в развитых странах. Частоты растут по мере того, как все больше людей доживают до старости, и по мере возникновения изменений образа жизни в развивающихся странах. По состоянию на 2010 год финансовые затраты на лечение рака были оценены в 1,16 триллиона долларов США в год. Из этого следует, что существует потребность в более эффективных и безопасных способах лечения или искоренения этого заболевания. Иммуноterapia, при которой используют природные защитные системы организма для уничтожения aberrантных тканей, признана более безопасной, чем меры химического воздействия, но для эффективности иммуноterapia должна быть специфической для рака. Кроме того, открытие иммунотерапии, которая является эффективной против любого типа рака, было бы чрезвычайно полезным, поскольку она не только могла бы назначаться индивидуумам, страдающим множеством различных типов рака (т.е. она могла бы применяться для всей популяции), но также могла бы назначаться одному индивидууму, страдающему более чем одним типом рака. Кроме того, идентификация иммунотерапии, которая не была бы

рестриктированной по МНС, также была бы чрезвычайно полезной, поскольку это означает, что она могла бы назначаться любому индивидууму независимо от МНС-типа ткани.

Т-клетки, которые идентифицированы здесь авторами настоящего изобретения, обладают вышеуказанными преимущественными характеристиками, поскольку они эффективны против любого типа рака, и они не рестриктированы по МНС, а значит, применимы для всей популяции из-за повсеместной экспрессии продукта гена SCNN1A, который требуется для распознавания.

Заявления об изобретении

В соответствии с первым аспектом настоящего изобретения предоставляется опухолеспецифический Т-клеточный рецептор (TCR), или его фрагмент, характеризующийся по крайней мере одним определяющим комплементарность участком (CDR), включающим или состоящим из CATWDRRDYKRLF (SEQ ID NO:1) и/или CALGVLPTVTGGGLIF (SEQ ID NO:2).

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный CDR включает или состоит из (CDR) CATWDRRDYKRLF (SEQ ID NO:1) и/или CALGVLPTVTGGGLIF (SEQ ID NO:2) или CDR, который идентичен ему на по крайней мере 88%, например 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%.

Описанные здесь CDR представляют собой CDR3 указанного TCR, а значит, являются основными CDR, ответственными за распознавание процессированного антигена или лиганда. Другие CDR (CDR1-гамма, CDR2-гамма, CDR1-дельта и CDR2-дельта) кодируются зародышевой линией. Следовательно, настоящее изобретение, кроме того, касается TCR, также включающего один или более из этих других CDR, т.е. CDR1-гамма, CDR2-гамма, CDR1-дельта или CDR2-дельта в комбинации с указанной одной и более последовательностей CDR3.

Соответственно, в предпочтительном варианте осуществления указанный TCR содержит или состоит из одного или более, включая любую комбинацию, следующих определяющих комплементарность участков:

VTNTFY (CDR1 γ) SEQ ID NO:3

YDVSTARD (CDR2 γ) SEQ ID NO:4

TSWWSYY (CDR1 δ) SEQ ID NO:5

QGS (CDR2 δ) SEQ ID NO:6

Ссылка здесь на опухолеспецифический TCR относится к TCR, который специфически распознает опухолевую клетку или лиганд опухолевой клетки, в связи с экспрессией гена SCNN1A, и активируется тем же, но не активируется неопухоловой клеткой или лигандом неопухоловой клетки.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный TCR представляет собой $\gamma\delta$ TCR, имеющий γ -цепь и δ -цепь, и указанный CDR указанной γ -цепи включает или состоит из CDR: CATWDRRDYKRLF (SEQ ID NO:1) или CDR, который идентичен ему на по крайней мере 88%, например 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,

96%, 97%, 98% или 99%; а указанный CDR указанной δ -цепи включает или состоит из CALGVLPTVTGGGLIF (SEQ ID NO:2) или CDR, который идентичен ему на по крайней мере 88%, например 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%. Соответственно, указанный TCR может содержать один или оба из вышеупомянутых CDR, а в предпочтительном варианте осуществления содержит оба из указанных CDR.

В дальнейшем предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный CDR указанного TCR дополнительно или альтернативно включает или состоит из последовательности гамма-цепи, которая представляет собой CALWEVDYKKLF (SEQ ID NO:9), и/или последовательности дельта-цепи, которая представляет собой CALGEPVLFVAVRGLIF (SEQ ID NO:10) и/или CACDLLGDRYTDKLI (SEQ ID NO:11), или CDR, который идентичен ему на по крайней мере 88%, например 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления указанный TCR является необычным, поскольку он не рестриктирован по MHC, точнее он связывается с опухолеспецифическим лигандом в связи с экспрессией гена SCNN1A. Тот факт, что эти Т-клетки и их TCR не рестриктированы по MHC, означает, что они обладают пан-популяционным терапевтическим потенциалом, а значит, представляют собой чрезвычайно важную новую противораковую терапию.

В дальнейшем предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанная γ -цепь TCR включает или состоит из: SSNLEGRTKSVTRQTGSSAEITCDLTVTNTFYIHWYLHQEGKAPQRLLYYDVSTARDVLESGLSPGKYTHTPRRWSWILRLQNLINDSGVYYCATWDRRDYKKLFGSGTTLVVDKQLDADVSPKPTIFLPSIAETKLQKAGTYLCLLEKFFPDVIKHWQEKKSNTILGSQEGNTMKTNDTYMKFSWLTVPKSLDKEHRCIVRHENKNGVDQEIPPIKT (SEQ ID NO:7) или последовательности, которая идентична ей на по крайней мере 88%, например 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%.

В дальнейшем предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанная δ -цепь TCR включает или состоит из: AQKVTQAQSSVSMPVRKAVTLNCLYETSWWSYYIFWYKQLPSKEMIFLIRQGSDEQNAKSGRYSVNFKKAAKSVALTISALQLEDSAKYFCALGVLPTVTGGGLIFGKGTRVTVPEPNSQPHTKPSVFVMKNGTNAVCLVKEFYPKDIRINLVSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAVKLGKYEDSNSVTCSVQHDKTVHSTDFEVKTDST (SEQ ID NO:8) или последовательности, которая идентична ей на по крайней мере 88%, например 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%.

(В вышеприведенных абзацах жирный и подчеркнутый текст представляет собой CDR, т.е. 1, 2 и 3, в этом порядке).

В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный TCR содержит указанную выше γ -цепь TCR и указанную выше δ -цепь TCR.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления указанный TCR представляет собой растворимый TCR или sTCR, а значит, в нем отсутствуют

трансмембранный домен и, в идеале, также внутриклеточный домен.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный TCR является частью химерного рецептора, обладающего описанной здесь функциональностью. В идеале, указанный TCR слит с константным доменом $\alpha\beta$ TCR.

В альтернативном варианте предоставляется фрагмент указанного TCR, такой как его мономерная часть, в идеале одноцепочечная форма TCR.

В соответствии с дальнейшим аспектом настоящего изобретения предоставляется Т-клетка, экспрессирующая указанный TCR по настоящему изобретению, в идеале, или в растворимой, или мембранно-сочетаемой форме, т.е. имеющий трансмембранную область и внутриклеточную область.

В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения предоставляется клон Т-клеток, экспрессирующий указанный TCR по настоящему изобретению, в идеале, или в растворимой, или мембранно-сочетаемой форме, т.е. имеющий трансмембранную область и внутриклеточную область. Предпочтительно, когда указанный клон представляет собой клон SW.3G1, описанный здесь.

В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения предоставляется вектор, кодирующий указанный TCR по настоящему изобретению.

В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения предоставляется фармацевтическая композиция, или иммуногенный агент, или биспецифическое средство, или вакцина, содержащая указанный TCR, или клетку, или клон, или вектор по настоящему изобретению.

В предпочтительном варианте осуществления указанную фармацевтическую композицию, или иммуногенный агент, или биспецифическое средство используют для лечения любого рака, но в идеале - колоректального рака, рака легкого, почки, предстательной железы, мочевого пузыря, шейки матки, меланомы (рака кожи), рака кости, молочной железы, яичника, крови, головного мозга, поджелудочной железы, яичка, яичника, головы/шеи, печени, мочевого пузыря, щитовидной железы и матки.

В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения предоставляется TCR, или клетка, или клон, или вектор, описанный здесь, для применения для лечения рака.

В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения предоставляется способ лечения рака, включающий введение указанного TCR, или клетки, или клона, или вектора индивидууму, подлежащему лечению.

В идеале, указанный рак относится к любому типу, но в особенности к колоректальному раку, раку легкого, почки, предстательной железы, мочевого пузыря, шейки матки, меланоме (раку кожи), раку кости, молочной железы, крови, головного мозга, поджелудочной железы, яичка, яичника, головы/шеи, печени, мочевого пузыря, щитовидной железы и матки.

В предпочтительном способе по настоящему изобретению указанный TCR, клетку, клон или вектор вводят в комбинации с противоопухолевым средством, таким как, но без ограничения этим, биспецифическое средство.

Ссылка здесь на биспецифическое средство является ссылкой на биспецифическое моноклональное антитело (BsMAb, BsAb), которое представляет собой искусственный белок, который может одновременно связываться с двумя различными типами антигена.

Тем не менее, альтернативно, указанный TCR может образовывать часть биспецифического средства, причем указанное биспецифическое средство включает указанный TCR, с целью связывания с его лигандом на раковой клетке, а также активирующий иммунную клетку компонент или лиганд, который связывает и таким образом активирует иммунную клетку, такую как Т-киллер.

В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения предлагается применение указанного TCR, или клетки, или клона, или вектора для производства лекарственного средства для лечения рака.

В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения предоставляется комбинированное терапевтическое средство для лечения рака, включающее:

а) указанный TCR, или клетку, или клон, или вектор, или иммуногенный агент или биспецифическое средство, или вакцину в комбинации с

б) дополнительным противораковым терапевтическим средством.

В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения предоставляется TCR, или полипептид, или биспецифическое средство, или антитело, или фрагмент указанного антитела, который связывается с по крайней мере одной из изоформ продукта гена SCNNA1, показанных на фиг. 9, и, в частности, с их экстраклеточным доменом.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный полипептид, антитело или фрагмент ингибирует активность указанного продукта гена SCNNA1 и, в случае указанного антитела, наиболее предпочтительно является моноклональным.

В формуле изобретения, которая следует, и в предшествующем описании настоящего изобретения, за исключением случаев, когда контекст требует иного вследствие языка представления или необходимого значения, слово «содержат (включают)» или такие варианты, как «содержит» или «содержащий», используется в смысле включения, т.е. для указания наличия заявленных признаков, а не для исключения наличия или добавления дополнительных признаков в различных вариантах осуществления настоящего изобретения.

Все ссылки, включая любой патент или заявку на патент, приведенные в этом описании, тем самым включены посредством ссылки. Не допускается, что какая-либо ссылка представляет собой известный уровень техники. Кроме того, не допускается, что что-нибудь из предшествующего уровня техники является частью общих знаний в данной области техники.

Предпочтительные признаки каждого аспекта настоящего изобретения могут быть такими, как описано в связи с любым из других аспектов.

Другие признаки настоящего изобретения станут очевидными из следующих примеров. Вообще говоря, настоящее изобретение распространяется на любой новый

признак или любую новую комбинацию признаков, раскрытых в этом описании (включая прилагаемую формулу изобретения и чертежи). Таким образом, следует понимать, что признаки, целые числа, характеристики, соединения или химические компоненты, описанные в связи с конкретным аспектом, вариантом осуществления или примером настоящего изобретения, применимы к любому другому аспекту, варианту осуществления или примеру, описанному здесь, если они не являются несовместимыми с ним.

Кроме того, если не указано иное, любой раскрытый здесь признак может быть заменен альтернативным признаком, служащим той же или аналогичной цели.

Во всем описании и формуле этого изобретения единственное число включает множественное число, если контекст не требует иного. В частности, когда используется неопределенный артикль, описание следует понимать как предполагающее множественность, а также единственность, если контекст не требует иного.

Вариант осуществления настоящего изобретения теперь будет описан лишь в качестве примера со ссылкой на следующее, где:

На фиг. 1 показано, как клонотипировали линию $\gamma\delta$ Т-клеток, реагирующих на линии аутологичных и неаутологичных лимфобластоидных клеток (LCL), и обнаружили, что она экспрессирует TCR, состоящий из генов TRGV3 и TRDV1 с CDR3 CATWDRRDYKRLF (SEQ ID NO:1) и CALGVLPTVTGGGLIF (SEQ ID NO:2), соответственно. Путем предельного разведения выращивали клон, который экспрессировал этот TCR и был назван SW.3G1. (А) Очищенные $\gamma\delta$ Т-клетки от здорового донора, 9909, примировали (день 0) и повторно стимулировали (день 14) пулом LCL от трех доноров (0439, pt146 и Hom-2). В день 28 линию Т-клеток инкубировали с LCL, используемыми для примирования, а также с аутологичными LCL-9909 в течение 4 часов с активацией, оцениваемой по включению TAPI-0, антител против CD107a и TNF α . Активированные клетки сортировали с помощью проточной цитометрии, и Т-клеточные рецепторы (TCR) анализировали с помощью секвенирования следующего поколения. Секторные диаграммы показывают долю идентифицированных цепей и CDR3 (определяющих комплементарность участков) TCR, которые присутствовали в отсортированных клетках. Процент активированных клеток для точечных диаграмм в качестве представления данных проточной цитометрии показан над каждым дискриминационным окном. Т-клеточный клон SW.3G1, полученный из линий, экспрессирует выделенные цепи TCR, при этом полная последовательность TCR представлена на фиг. 2. (В) Клон SW.3G1 фенотипировали с использованием антител, и он, как было подтверждено, экспрессирует δ 1-цепь TCR-1. SW.3G1 не экспрессировал $\alpha\beta$ TCR или гликопротеины CD8 или CD4, связанные с распознаванием конвекционных антигенов пептид-HLA.

На фиг. 2 представлена последовательность γ - и δ - цепей Т-клеточного рецептора (TCR) клона SW.3G1. Структуры мПНК (наверху) показывают, что для каждой цепи CDR1 и CDR2 кодируются в зародышевой линии. CDR3 является продуктом множественности J-сегментов в соединениях V-J цепи Т-клеточного рецептора (TCR) и соединениях V-D-J в цепи TCR. Следовательно, CDR3 является гипервариабельным. Цветная маркировка,

принятая для петель CDR, сохраняется на протяжении всей фигуры. Области, окрашенные серым цветом, представляют константные и переменные домены TCR (не включая гиперпеременные петли CDR). На панели справа показано ожидаемое сворачивание белка. TCR принимают схожие третичные структуры, в которых петли определяющих комплементарность участков (CDR) располагаются на дистальном от мембраны конце молекул. Вместе шесть петель CDR образуют антигенсвязывающий сайт.

На фиг. 3 показано, что SW.3G1 может распознавать и уничтожать аутологичные и неаутологичные LCL, но не здоровые клетки с происхождением из различных тканей. (A) Совместная инкубация SW.3G1 с LCL в течение 4 часов с активацией, оцененной по включению TAPI-0, антител против CD107a и TNF α . (B) Анализ цитотоксичности на основе высвобождения хрома в течение 6,5 часов с использованием тех же LCL, что и в (A). (C) Аутологичные В-клетки от здорового донора 9909, магнитным способом очищенные непосредственно ex-vivo, использовали в анализах активации, как в A, при этом LCL-9909 использовали в качестве положительного контроля для активации. (D) Анализы активации, как в A, с использованием LCL-9909 и линий здоровых клеток, CIL-1 (клетки непигментированного цилиарного эпителия человека) и Hep2 (гепатоциты). Показан процент клеток, отсортированных путем установки дискриминационного окна.

На фиг. 4 показан SW.3G1-опосредованный лизис LCL от нескольких доноров, у которых нет общего HLA, и ряд линий раковых клеток из различных тканей. SW.3G1 использовали в 6,5-часовых анализах цитотоксичности на основе высвобождения хрома. (A) Ряд лимфобластных клеточных линий (LCL) от 24 доноров (с названиями по оси X). Красные столбцы для LCL, использованных для создания линий Т-клеток от донора 9909, исходя от которого был клонирован SW.3G1. Соотношение Т-клеток и LCL составляло 1:1. (B) SW.3G1-опосредованное уничтожение ряда линий раковых клеток (с названиями по оси X) с происхождением из различных тканей (разъяснение) при соотношении Т-клеток и раковых клеток, составляющем 10:1.

На фиг. 5 показано, что SW.3G1 не распознает клетки-мишени с помощью известных механизмов. (A) Клон $\gamma\delta$ SW.3G1 совместно инкубировали в течение 4 ч с HMB-PP, лимфобластной клеточной линией (LCL)-9909 и фитогемаглюттинином (PHA). Т-клетки также инкубировали отдельно. Активацию Т-клеток оценивали по включению TAPI-0, антител против CD107a и TNF α , при этом процент активированных клеток показан над отсортированными путем установки дискриминационного окна клетками. (B) Используя тот же анализ активации, что и в (A), SW.3G1 инкубировали с LCL, которые были предварительно помечены антителами (Ab), которые связываются с белками с названиями по оси X. SW.3G1 также инкубировали с LCL без антител (контроль без антитела). Процент реактивности показан графически (ось Y). MICA/B (связанная с главным комплексом гистосовместимости (MHC) класса I цепь A/B) и EPCR (эндотелиальный рецептор белка C). Антитела против MHC класса I и II также были включены.

На фиг. 6 показан подход к функциональному скринингу всего генома с использованием системы CRISPR/Cas9, используемый для идентификации генов/белков-

кандидатов, участвующих в распознавании клеток-мишеней с помощью SW.3G1.

На фиг. 7 представлены результаты подхода к функциональному скринингу всего генома с использованием системы CRISPR/Cas9, который идентифицировал множество генов-кандидатов для распознавания клеток-мишеней с помощью SW.3G1. (A) Аутологичные LCL-9909 и линию раковых клеток KBM7 трансдуцировали библиотекой CRISPR/Cas9 для скрининга всего генома. Библиотеки подвергались нескольким отборам с использованием клона Т-клеток SW.3G1 для создания линии клеток-мишеней, которая была бы устойчивой к лизису. Выжившие клетки-мишени (после отбора) тестировали вместе с линиями клеток до отбора в анализах активации с использованием SW.3G1. Активацию оценивали по включению TAPI-0, антител против CD107a и TNF α . (B) Секвенирование библиотек после отбора выявило обогащенные направляющие РНК, соответствующие генам, показанным на (C). (C) Гены-кандидаты, наблюдаемые в библиотеках LCL-9909 и KBM7 или только в случае LCL-9909 или KBM7. Названия генов и (белков) представлены со ссылками на вебсайты для получения дополнительной информации.

На фиг. 8 представлена информация о гене/белке-кандидате SCNN1A, который был идентифицирован с помощью подхода с использованием библиотеки CRISPR/Cas9 к скринингу всего генома.

На фиг. 9 представлена каноническая последовательность белка SCNN1A, которая совмещена с пятью экспрессированными вариантами сплайсинга. Изоформа 1 является канонической последовательностью (Изоформа 1 в UniProt - P37088-1). Аминокислоты, выделенные черным цветом: область, используемая для получения поликлонального антитела, использованного в этом исследовании. Красным цветом: Сайты в вариантах белка, возникающие вследствие отличий аминокислотных остатков от показанных. Аминокислотные остатки вариантов белка здесь не отображены, но их можно найти на сайте: <http://www.uniprot.org/uniprot/P37088>. Синим цветом: аминокислотные различия между изоформами сплайсинга.

На фиг. 10 представлены результаты экспериментов для проверки роли SCNN1A в распознавании клеток-мишеней с помощью SW.3G1. (A) Схематическое изображение гена и белка SCNN1A с сайтами для направляющих РНК (gRNA) из библиотеки GeCKO для всего генома (номер 1) и другой проверяемой gRNA, нацеленной на последовательность SCNN1A, которая была разработана авторами настоящего изобретения (номер 2). Фигура заимствована из Chen 2014. (B) Длительный анализ уничтожения, используя SW.3G1, с использованием клеток LCL.174 дикого типа, клеток LCL.174, нокаутированных с помощью gRNA-1 GeCKO и gRNA-2. (C) Анализ помощью Вестерн-блоттинга линии клеток рака молочной железы MDA-MB-231, которая получила gRNA-2, специфичную для SCNN1A. Клетки дикого типа, используемые для сравнения, при этом красная стрелка указывает на белок SCNN1A с М.м. 76 кДа. (D) Клетки MDA-MB-231 из (C) и меланомы MM909.24, линии клеток дикого типа и с нокаутом SCNN1A (KO), используемые в длительных анализах уничтожения с помощью SW.3G1. Раковые клетки использовали в

качестве линий, и отбирали в результате обработки пурамицином те, которые экспрессируют gRNA, без последующего клонирования клеток.

На фиг. 11 показано, что перенос TCR из SW.3G1 придает $\alpha\beta$ T-клеткам от трех здоровых доноров способность реагировать на клетки-мишени. (А) Очищенные CD8⁺ T-клетки от трех доноров котрансдуцировали цепями T-клеточного рецептора SW.3G1 (маркер и очистка через крысиный (r)CD2) и направляющей РНК (gRNA), чтобы сделать реципиентные T-клетки негативными по TCR β -цепи (с отбором путем обработки пурамицином) (Legut et al 2017). Чистоту клеток проверяли с помощью антитела против rCD2 и антитела против $\gamma\delta$ TCR. (В) Клетки от одного донора тестировали в длительных анализах уничтожения (нижний график). Использовали линии клеток LCL.174: клетки дикого типа, с нокаутом SCNN1A (с использованием gRNA-1 и -2) и нокином SCNN1A (клетки КО, которые получили оптимизированный в отношении частоты использования кодонов трансген SCNN1A).

Подробное описание

Методы и материалы

Получение и клонотипирование линии T-клеток

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) из крови здорового донора (код 9909) очищали с помощью стандартного разделения в градиенте плотности. Преобладающая популяция $\gamma\delta$ T-клеток в периферической крови экспрессирует V γ 9V δ 2 TCR и обычно реагирует на антигены, происходящие от бактерий. С целью обогащения $\gamma\delta$ TCR⁺/V δ 2⁻ T-клеток, тем самым увеличивая вероятность обнаружения способных реагировать на рак T-клеток, авторы настоящего изобретения модифицировали протокол очистки на магнитной основе. Первой адаптацией было окрашивание PBMC конъюгированным с PE антителом против V δ 2 (клоном B6, BioLegend, San Diego, CA). Затем $\gamma\delta$ TCR⁺ T-клетки негативным образом обогащали путем прямого удаления $\gamma\delta$ TCR-клеток в соответствии с инструкциями производителя (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Германия). Вторая адаптация включала добавление микрошариков против PE (Miltenyi Biotec) к шарикам набора для очистки $\gamma\delta$ TCR, тем самым удаляя клетки δ 2⁺ клетки одновременно с $\gamma\delta$ TCR- клетками. Очищенные клетки совместно инкубировали с облученными (3000-3100 рад) LCL от трех доноров, которые были получены из PBMC путем иммортализации В-клеток с помощью вируса Эпштейна-Барра (EBV). Все LCL выращивали в среде R10 (RPMI-1640, 10% инактивированной нагреванием фетальной сыворотки теленка, 2 mM L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, все от Life Technologies, Carlsbad, CA) в виде суспензионных клеточных культур. Через 14 дней T-клетки повторно стимулировали облученными LCL от тех же доноров. В день 28 T-клетки собирали и использовали в анализах активации для оценки реактивности по отношению к LCL. T-клетки (30000) инкубировали в течение 4 ч в планшетах с 96 U-образными лунками с эквивалентным количеством LCL. 30 mM ингибитора-0 процессинга TNF α (TAPI-0 от Sigma Aldrich) (Haney et al., 2011), антитела против CD107a (H4A2, Becton Dickinson (BD), Franklin Lakes, NJ) и антитела против TNF α

(сА2, Miltenyi Biotec) добавляли в среду для анализа в начале анализа, при этом клетки затем окрашивали красителем для определения жизнеспособности клеток, Vivid (Life Technologies, в разведение 1:40 в PBS, затем 2 мкл на окрашивание в 50 мкл) и антителом против CD3 (BW264/56, Miltenyi Biotec). Активированные клетки сортировали на BD FACS Aria в буфере RLT Plus (с добавлением 40 мМ DTT) (Qiagen), готовом для секвенирования цепей TCR. РНК экстрагировали с использованием набора RNEasy Micro (Qiagen, Hilden, Германия). кДНК синтезировали, используя набор 5'/3' SMARTer (Clontech, Paris, Франция) в соответствии с инструкциями производителя. В подходе с использованием SMARTer использовалась обратная транскриптаза вируса лейкоза мышей Молони (MMLV), 3' олиго-dT праймер и 5' олигонуклеотид для получения кДНК-матриц, которые были фланкированы известной универсальной якорной последовательностью. ПЦР проводили с использованием специфичных для якоря прямых праймеров и обратных праймеров, специфичных для константных областей γ - или δ -цепей TCR. Конечные продукты ПЦР очищали в геле и готовили для секвенирования следующего поколения (Donia et al., 2017).

Получение и фенотипирование клона SW.3G1

T-клетки клонировали непосредственно из линии T-клеток путем предельного разведения (Theaker et al., 2016). После 4 недель культивирования 50% каждого клона по объему культуры собирали и использовали для анализов активации с помощью LCL, как описано выше. Перед проведением анализов активации клоны T-клеток промывали и инкубировали в течение 24 ч в среде с пониженным содержанием сыворотки. Клоны, которые проявляли реактивность по отношению к LCL, выращивали до количеств, достаточных для секвенирования TCR (ниже). Клон SW.3G1 окрашивали антителами для выявления экспрессии на поверхности CD3 (Miltenyi Biotec), CD8 (BW135/80, Miltenyi Biotec), CD4 (M-T466, Miltenyi Biotec), $\alpha\beta$ TCR (BW242/412, Miltenyi Biotec) и V δ 1-цепи TCR (REA173, Miltenyi Biotec).

Секвенирование TCR SW.3G1

Как указано выше, для секвенирования линий T-клеток очищенные продукты ПЦР после последней ПЦР клонировали в Zero-Blunt TOPO и трансформировали в химически компетентные клетки One Shot® *E. coli* для стандартного секвенирования (оба из Life Technologies).

SW.3G1 распознает LCL, но не здоровые клетки

Для подтверждения реактивности SW.3G1 по отношению к LCL выполняли анализы активации, как описано выше, и анализы цитотоксичности на основе высвобождения хрома. Здоровые В-клетки от донора 9909 очищали с использованием PE-конъюгированного антитела против CD19 (HIB19, Miltenyi Biotec) и прямого захвата микрошариками с антителами против PE (Miltenyi Biotec) и сразу использовали в анализах. Другие линии здоровых клеток и запатентованные культуральные среды для них получали от Sciencell (Carlsbad, CA): CIL-1 (клетки не пигментированного цилиарного эпителия человека) и Hep2 (гепатоциты человека) использовали в анализах активации, как описано выше.

SW.3G1 уничтожал все протестированные линии иммортализованных и раковых клеток

LCL и опухолевые клетки метили хромом 51 для анализов цитотоксичности (Ekeruche-Makinde et al., 2012), с использованием соотношений Т-клеток и клеток-мишеней, составляющих 1:1 (в случае LCL) или 10:1 (в случае раковых клеток). LCL поддерживали, как описано выше. Линии раковых клеток (номер в ATCC® для справочной информации и информации о культуре)/ткани происхождения: SiHa (HTB-35) и MS751 (HTB-34)/шейка матки; MCF7 (HTB-22), MDA-MB-231 (CRM-HTB-26) и SKBR3 (HTB-30)/молочная железа; TK143 (CRL-8303) и U2OS (HTB-96)/кость; HCT-116 (CCL-247) и Colo205 (CCL-222)/ободочная кишка; Jurkat (TIB-152), K562 (CCL-243), THP-1 (TIB-202), U266 (TIB-196) и Molt-3 (CRL-1552)/кровь; Caki-1 (HTB-46)/почка; A549 (CCL-185) и H69 (HTB-119)/легкое. MM909.11, MM909.12, MM909.15, MM909.46 и MM909.24 представляют собой меланомы кожи, полученных от пациентов с раком, получавших лечение в Center for Cancer Immune Therapy (CCIT, Herlev Hospital, Copenhagen, Дания). Линии клеток «ММ» и меланомы Mel 526 и Mel 624 поддерживали в виде адгезивных клеток в R10, пассировали один раз в неделю или при необходимости с целью слияния на 20-80%. Клетки отсоединяли от матрасов для культивирования тканей путем промывания D-PBS с последующей инкубацией с D-PBS и 2 mM EDTA при 37°C до отсоединения.

SW.3G1 не распознает клетки-мишени с помощью известных механизмов

Активатор V γ 9V δ 2 Т-клеток (E)-4-гидрокси-3-метил-бут-2-енилпирофосфат (HMB-PP) (Sigma Aldrich) перерастворяли и в DMSO и добавляли непосредственно в аналитические лунки. Для анализов блокирования использовали следующие моноклональные антитела: антитело против HLA, -B, -C (клон W6/32, Biolegend), антитело против HLA-DR, -DP, -DQ (клон Tu39, Biolegend), антитело против EPCR (поликлональное, R&D Systems), антитело против MICA/MICB (клон 6D4, BioLegend) и антитело против CD1d (клон 51.1, Miltenyi Biotec) использовали в конечной концентрации 10 мкг/мл.

Введения вставок/делций в гены с помощью CRISPR по всему геному

Использовали подход к скринингу всего генома с использованием библиотеки CRISPR/Cas9 (фиг. 5 для обзора). LCL-9909 и KBM7 с целенаправленным нокаутом по всему геному, используя суббиблиотеки A и B GeCKO v2 (плазмиду Adgene, # 1000000048, любезно предоставленную Dr. Feng Zhang), использовали для отбора с помощью SW.3G1. Вкратце, успешно трансдуцированные клетки-мишени, отобранные с использованием пурамицина, инкубировали вместе с SW.3G1 в predetermined соотношении в течение 2-3 недель в планшетах с 96 U-образными лунками. Анализы активации (как указано выше) проводили с клетками-мишенями до или после отбора, чтобы подтвердить утрату активности SW.3G1 по отношению к отобранным клеткам. Геномную ДНК из клеток-мишеней, которые выдерживали два цикла отбора с помощью SW.3G1, использовали для секвенирования следующего поколения для обнаружения вставленных направляющих РНК и генов-кандидатов.

Подтверждение роли SCNN1A в распознавании клеток-мишеней

Лентивирусные частицы получали путем трансфекции с использованием хлорида кальция клеток HEK293T и концентрировали с помощью ультрацентрифугирования перед трансдукцией клеток-мишеней, используя 8 мкг/мл полибрена и трансфекцию при центрифугировании. gRNA клонировали в плазмиду pLentiCRISPR v2 (любезно предоставленную Dr. Feng Zhang, плазмиду Addgene 52961), которая кодирует белок SpCas9 и маркерный ген устойчивости к пуромицину (рас, пуромицин-N-ацетилтрансферазу), и котрансфицировали вместе с плазмидами pMD2.G и psPAX2 для упаковки и оболочки (все от Addgene). Полноразмерный оптимизированный в отношении частоты использования кодонов трансген SCNN1A (Изоформу 1, UniProt P37088-1) клонировали в лентивирусный вектор для переноса 3-го поколения pELNS (любезно предоставленный Dr. James Riley, University of Pennsylvania, PA). Вектор pELNS содержит ген CD2 крысы (rCD2) для отбора клеток с использованием антитела против rCD2, конъюгированного с PE (OX-34, BioLegend). Экспрессию SCNN1A в клетках-мишенях оценивали, используя кроличье поликлональное антитело против SCNN1A (PA1-902A, ThermoFisher Scientific) для анализа с помощью проточной цитометрии (не представленные данные) и Вестерн-блоттинга в соответствии с инструкциями производителя.

Трансдукция поликлональных Т-клеток с использованием TCR SW.3G1 обеспечивает распознавание опухоли.

Оптимизированные в отношении частоты использования кодонов, полноразмерные цепи TCR, разделенные саморасщепляющейся последовательностью 2A, были синтезированы (Genewiz) и клонированы в лентивирусный вектор для переноса 3-го поколения pELNS (любезно предоставленный Dr. James Riley, University of Pennsylvania, PA). Вектор pELNS содержит маркерный ген CD2 крысы (rCD2), отделенный от TCR другой саморасщепляющейся последовательностью 2A. Кроме того, клетки котрансдуцировали gRNA для устранения экспрессии β -цепи TCR в клетках-реципиентах путем таргетирования обоих константных доменов TCR- β (рукопись в настоящее время находится в Blood для публикации). Лентивирусные частицы получали путем трансфекции с использованием хлорида кальция клеток HEK293T. Векторы для переноса TCR котрансфицировали вместе с плазмидами для упаковки и оболочки pMD2.G, pRSV-Rev и pMDLg/pRRE. Лентивирусные частицы концентрировали с помощью ультрацентрифугирования перед трансдукцией CD8⁺ Т-клеток, используя 5 мкг/мл полибрена, при этом CD8⁺ Т-клетки от трех здоровых доноров очищали с помощью магнитного отделения (Miltenyi Biotec) не позднее, чем за 24 часа, и активировали в течение ночи шариками с CD3/CD28 (Dynabeads, Life Technologies) в соотношении шариков и Т-клеток, составляющем 3:1. Т-клетки, которые захватили вирус, отбирали путем инкубации с 2 мкг/мл пуромицина (с нокаутом β -цепи TCR) и обогащали с использованием PE-конъюгированного антитела против rCD2 (OX-34, BioLegend), а затем магнитных шариков с антителами против PE (Miltenyi Biotec). Через 14 дней после трансдукции Т-клетки размножали с использованием аллогенных фидерных клеток и РНА. Трансдуцированные

TCR клетки использовали в длительных анализах уничтожения, в соответствии с которыми мишени LCL.174 высевали в двух повторах с плотностью 50000 клеток/лунку в планшеты с 96 U-образными лунками. SW.3G1 добавляли к мишени и инкубировали в течение 7 дней. Клетки-мишени также высевали без Т-клеток, чтобы служить контролем 100% выживания. Клетки собирали, промывали PBS и окрашивали Vivid и антителом против CD3 (для исключения Т-клеток). В качестве внутреннего контроля в каждую лунку перед сбором/промывкой добавляли шарики для абсолютного счета CountBright™ (Life Technologies) (приблизительно 10000 шариков/лунку). Для получения информации об образцах использовали на FACS Canto II, и для каждого образца собирали по крайней мере 1000 событий с шариками. Выживаемость клеток-мишеней рассчитывали по следующей формуле:

$$\% \text{ выживания} = \left(\frac{\text{количество экспериментальных событий с клетками}}{\text{количество экспериментальных событий с шариками}} \right) / \left(\frac{\text{количество событий с контрольными клетками}}{\text{количество событий с контрольными шариками}} \right) \times 100\%$$

Результаты

ХАРАКТЕРИСТИКА КЛОНА

1. Очищенные $\gamma\delta$ Т-клетки от здорового донора (9909) примировали и повторно стимулировали пулом из трех неаутологичных лимфобластоидных клеточных линий (-0439, -pt146 и -НОМ-2). Способность реагировать на каждую из линий клеток проверяли в день 28 (фиг. 1). Линия Т-клеток также распознала аутологичные клетки LCL-9909 (фиг. 1).

2. Т-клетки вышеупомянутой линии сортировали с помощью проточной цитометрии на основе способности реагировать на каждую из LCL, и их TCR анализировали с помощью секвенирования следующего поколения (фиг. 1). Для секвенирования γ -цепи два уникальных CDR3 присутствовали в случае переменных цепей TRGV9 и TRGV3. Для δ -цепей три CDR3 присутствовали в случае переменных цепей TRDV1 и TRDV2.

3. Клоны Т-клеток, полученные из линии Т-клеток от донора 9909, экспрессировали $\gamma\delta$ 1 TCR и CDR3 CATWDRRDYKKL и CALGVLPTVTGGGLIF в случае каждой соответствующей цепи (фиг. 1 и фиг. 2). Все выросшие клоны экспрессировали один и тот же TCR. Этот клон был назван SW.3G1.

Окрашивание SW.3G1 подтвердило экспрессию V δ 1-цепи и $\alpha\beta$ TCR⁺/CD8^{низкий уровень}/CD4⁻ (фиг. 1B).

4. Анализы активации с использованием TNF α и CD107a в качестве считываний подтвердили реактивность SW.3G1 по отношению к аутологичным клеткам LCL-9909 и неаутологичным LCL-0439 (фиг. 3A). Доноры 9909 и 0439 полностью не соответствуют по HLA и по аллелям MHC класса I, и класса II, поэтому SW.3G1 распознает клетки-мишени HLA-независимым образом. SW.3G1 также был способен лизировать LCL-9909 и -0439 и, следовательно, является цитотоксичным (фиг. 3B). Распознавание LCL зависело от процесса immortalization, когда EBV инфицирует В-клетку, поскольку аутологичные здоровые В-клетки, очищенные непосредственно ex-vivo из донора 9909, не служили в качестве мишеней для SW.3G1 (фиг.3C). Аналогично, здоровые клетки CIL-1

(эпителиальные клетки) и Her2 (гепатоциты) не вызывали активацию SW.3G1 (фиг. 3D).

5. SW.3G1 был способен лизировать LCL от всех 24 протестированных доноров (фиг. 3B для аутологичных LCL и фиг. 4A для 23 неаутологичных LCL), что стало дополнительным подтверждением того, что SW.3G1 действует HLA-независимым образом. Более того, LCL.174 (фиг. 4A, 4-й столбец слева) экспрессирует только одну копию хромосомы 6, хромосомы человека, которая несет локус MHC. Хромосома 6 в клетке LCL.174 содержит большую делецию и не несет гены для MHC класса II и многих компонентов, вовлеченных в процессинг антигена MHC класса I.

6. SW.3G1 уничтожал 23 линии раковых клеток, которые происходят из 8 различных тканей: кожи/меланомы, почки, ободочной кишки, молочной железы, крови/лейкоза, легкого, шейки матки и кости. (фиг. 4B).

7. SW.3G1 не реагировал на известный антиген $\gamma\delta$ T-клеток, HMB-PP (фиг. 5A), который приводит к распознаванию клеток, инфицированных патогеном, подмножеством V γ 9V δ 2 TCR T-клеток аналогично распознаванию собственного пирофосфата. Для этого пути требуются клетки-мишени, экспрессирующие бутирофиллин 3A1. Способность SW.3G1 реагировать на LCL-9909 (аутологичные) -0439 и -pt146 не затруднялась при включении блокирующих антител, которые связывают известные лиганды $\gamma\delta$ T-клеток: связанная с главным комплексом гистосовместимости (MHC) класса I цепь A и B (MICA/MICB), EPCR (эндотелиальный рецептор белка C) и CD1d (фиг. 5B). Антитела против MHC класса I и класса II также не смогли заблокировать активацию SW.3G1. Хотя это и не обширное действие исключения, эти данные предполагают, что SW.3G1 может распознавать неизвестный лиганд для $\gamma\delta$ T-клеток на поверхности раковых клеток. Поэтому для поиска генов/белков-кандидатов, участвующих в распознавании клеток-мишеней с помощью SW.3G1, был применен подход с использованием библиотеки CRISPR/Cas9 к скринингу всего генома (фиг. 6).

8. Библиотеки CRISPR/Cas9 для скрининга всего генома использовали для создания нокауты генов в аутологичных LCL-9909 и линии гаплоидных клеток миелоидного лейкоза KBM7. Обе библиотеки совместно инкубировали с SW.3G1 для последующих циклов отбора с целью обогащения в отношении клеток-мишеней, содержащих gRNA, которые позволяли избежать лизиса, опосредуемого SW.3G1 (фиг. 7A). Реактивность SW.3G1 снижалась с 59% для LCL-9909 до отбора до 12% после отбора. В случае KBM7 реактивность менялась с 12% до 4,2%. LCL-9909 и KBM7 после отбора использовали для секвенирования следующего поколения для идентификации обогащенных gRNA. Были идентифицированы основные гены, при этом 4 из всех 7 генов были общими для библиотек LCL-9909 и KBM7 (фиг. 7B и 7C). Направляющие РНК, специфичные для гена SCNN1A (также используемого здесь для описания кодируемого белка), который кодирует белок альфа-субъединицу эпителиального натриевого канала 1, были в высокой степени обогащены и присутствовали в обеих библиотеках (фиг. 7B и C). Псевдонимы гена и белка SCNN1A представлены на фиг. 8. Белок экспрессируется на клеточной поверхности и поэтому является хорошим кандидатом для дальнейшего изучения. SCNN1A имеет 6

изоформ варианта сплайсинга и различные встречающиеся в природе мутации (фиг. 8 и 9).

9. LCL.174, трансдуцированные с использованием gRNA, специфичной для SCNN1A, из библиотеки для скрининга всего генома (GeCKO, gRNA-1) или другой разработанной авторами настоящего изобретения gRNA (gRNA-2) (фиг. 10A), больше не являлись мишенями для SW.3G1, подтверждая тем самым роль SCNN1A в распознавании клеток-мишеней (фиг. 10B), при этом лизис падал ниже 5% для нокаутированных клеточных линий по сравнению со 100%-ным уничтожением клеток дикого типа. Линии с нокаутом гена SCNN1A были созданы в двух типах раковых клеток, которые или частично, или полностью избежали лизиса с помощью SW.3G1 (фиг. 10C). Примечательно, что клетки с нокаутом гена SCNN1A, созданные в ходе этого исследования, использовали в качестве линий и не клонировали до проведения анализов. Это может объяснять остаточную реактивность, наблюдаемую для некоторых линий клеток с нокаутом, поскольку меньшая доля клеток в нокаутированной линии, вероятно, все еще экспрессирует SCNN1A благодаря ускользанию от селекции с использованием пурамицина и/или неудачного удаления гена SCNN1A. Анализ с помощью Вестерн-блоттинга нокаутированных по SCNN1A клеток MDA-MB-231, использованных для анализов активации с помощью SW.3G1, выявил значительное снижение белка SCNN1A в линии нокаутированных клеток по сравнению с клетками дикого типа (фиг. 10C), подтверждая нокаут гена. Используемое антитело может распознавать все изоформы SCNN1A (фиг. 9). Авторы настоящего изобретения также отметили, что клетки с нокаутом SCNN1A становились менее жизнеспособными в случае экстенсивного культивирования (3+ недели), и в некоторых случаях деление клеток полностью прекращалось. Это наблюдение было уникальным для gRNA, специфичной для SCNN1A, так как те же клеточные линии, трансдуцированные с использованием gRNA, специфичных для множества других генов, не демонстрировали такого же изменения роста и жизнеспособности клеток. Этот результат свидетельствует о том, что ген SCNN1A необходим для длительного роста клеток в культуре.

10. Перенос TCR SW.3G1 в поликлональные CD8+ Т-клетки от трех здоровых доноров придавал способность реагировать на клетку-мишень LCL-pt146 (фиг. 11A). Трансдуцированные TCR клетки демонстрировали тот же функциональный профиль, что и клетки с нокаутом SCNN1A, как описано выше для клона SW.3G1 (фиг. 11B). Чтобы дополнить данные о нокауте SCNN1A и еще раз подтвердить роль SCNN1A в распознавании клеток-мишеней, авторы настоящего изобретения трансдуцировали нокаутированные клетки геном SCNN1A. Введение нативного гена SCNN1A в нокаутированные клетки, экспрессирующие специфические для SCNN1A gRNA, привело бы к удалению трансгена. Поэтому был введен оптимизированный в отношении частоты использования кодонов ген, отличающийся от последовательности ДНК нативного гена (изоформы 1 в UniProt - P37088-1, фиг. 9), но экспрессирующий тот же белок. Уничтожение клеток, трансдуцированных gRNA-1 или gRNA-2, было устранено, но его можно было восстановить путем экспрессии гена SCNN1A в нокаутированных клетках (фиг. 11B).

Заключение

TCR SW.3G1 позволяет Т-клеткам распознавать широкий ряд опухолей. Распознавание происходит через продукт гена SCNN1A. Т-клеточный клон SW.3G1 распознает специфический для раковых клеток лиганд SCNN1A в отсутствие рестрикции по МНС.

Это изобретение сосредоточено вокруг TCR, идентифицированного в Т-клеточном клоне SW.3G1. Этот TCR распознает широкий ряд раковых клеток через экспрессию SCNN1A. Этот TCR не распознает неопухолевые клетки. Нокаут с помощью CRISPR/Cas9 SCNN1A в линиях опухолевых клеток или блокирование антителом подтвердили, что для распознавания опухолевых клеток Т-клеточным рецептором (TCR) требует генный продукт SCNN1A. TCR SW.3G1 может использоваться в различных стратегиях иммунотерапии рака. Широкое распознавание опухолей и независимость распознавания от лейкоцитарного антигена человека (HLA) открывают захватывающие возможности для пан-популяционной иммунотерапии против любого типа рака, используя TCR.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Chen, J., TR Kleyman and S. Sheng. 2014 Deletion of α -subunit exon 11 of the epithelial Na⁺ channel reveals a regulatory module. *Am J Physiol. Renal Physiol* 306, F561-7.

Donia, M., Kjeldsen, J.W., Andersen, R., Westergaard, M.C.W., Bianchi, V., Legut, M., Attaf, M., Szomolay, B., Ott, S., Dolton, G., Lyngaa, R., Hadrup, S.R., Sewell, A.K., Svane, I.M., 2017. PD-1+polyfunctional T cells dominate the periphery after tumor-infiltrating lymphocyte therapy for cancer. *Clin. Cancer Res.* clincanres.1692.2016.

Ekeruche-Makinde, J., Clement, M., Cole, D.K., Edwards, E.S.J., Ladell, K., Miles, J.J., Matthews, K.K., Fuller, A., Lloyd, K.A., Madura, F., Dolton, G.M., Pentier, J., Lissina, A., Gostick, E., Baxter, T.K., Baker, B.M., Rizkallah, P.J., Price, D.A., Wooldridge, L., Sewell, A.K., 2012. T-cell receptor-optimized peptide skewing of the T-cell repertoire can enhance antigen targeting. *J. Biol. Chem.* 287, 37269-81.

Haney, D., Quigley, M.F., Asher, T.E., Ambrozak, D.R., Gostick, E., Price, D.A., Douek, D.C., Betts, M.R., 2011. Isolation of viable antigen-specific CD8⁺ T cells based on membrane-bound tumor necrosis factor (TNF)-alpha expression. *J. Immunol. Methods* 369, 33-41.

Legut, M., G Dolton, A.A. Mian, O. Ottmann and A.K. Sewell. 2017 CRISPR-mediated TCR replacement generates superior anticancer transgenic T-cells. *Blood* [Epub ahead of print] doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2017-05-787598>

Patel, S.J., Sanjana, N.E., Kishton, R.J., Eidizadeh, A., Vodnala, S.K., Cam, M., Gartner, J.J., Jia, L., Steinberg, S.M., Yamamoto, T.N., Merchant, A.S., Mehta, G.U., Chichura, A., Shalem, O., Tran, E., Eil, R., Sukumar, M., Gujjarro, E.P., Day, C.-P., Robbins, P., Feldman, S., Merlino, G., Zhang, F., Restifo, N.P., 2017. Identification of essential genes for cancer immunotherapy. *Nature* 548, 537-542.

Theaker, S.M., Rius, C., Greenshields-Watson, A., Lloyd, A., Trimby, A., Fuller, A., Miles, J.J., Cole, D.K., Peakman, M., Sewell, A.K., Dolton, G., 2016. T-cell libraries allow simple parallel generation of multiple peptide-specific human T-cell clones. *J. Immunol. Methods* 430, 43-50.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Опухолеспецифический Т-клеточный рецептор (TCR), или его фрагмент, характеризующийся по крайней мере одним определяющим комплементарность участком (CDR), включающим или состоящим из (CDR) CATWDRRDYKCLF (SEQ ID NO:1) и/или CALGVLPTVTGGGLIF (SEQ ID NO:2), или CDR, который идентичен на по крайней мере 88% любому из двух CDR (т.е. SEQ ID NO:1 или 2).

2. Опухолеспецифический Т-клеточный рецептор (TCR) по п. 1, который содержит оба из указанных CDR.

3. Опухолеспецифический Т-клеточный рецептор (TCR) по п. 1 или 2, который содержит или состоит из одного или более, включая любую комбинацию, следующих определяющих комплементарность участков:

VTNTFY (CDR1 γ) SEQ ID NO:3

YDVSTARD (CDR2 γ) SEQ ID NO:4

TSWWSYY (CDR1 δ) SEQ ID NO:5

QGS (CDR2 δ) SEQ ID NO:6.

4. Опухолеспецифический Т-клеточный рецептор (TCR) по любому из п.п. 1-3, который представляет собой гамма-цепь, включающую или состоящую из: SSNLEGRTKSVTRQTGSSAEITCDLTVTNTFYIHWYHQEGKAPQRLLYYDVSTARDVLE SGLSPGKYTHTPRRWSWILRLQNLINDSGVYYCATWDRRDYKCLFGSGTTLVVTDK QLDADVSPKPTIFLPSIAETKLQKAGTYLCLLEKFFPDVIKIHWQEKKSNTILGSQEGNTM KTNDTYMKFSWLTVPKSLDKENRCIVRHENNKNGVDQEIIFPIKT (SEQ ID NO:7), или гамма-цепь, которая идентична ей на по крайней мере 88%.

5. Опухолеспецифический Т-клеточный рецептор (TCR) по любому из п.п. 1-3, который представляет собой дельта-цепь, включающую или состоящую из: AQKVTQAQSSVSMPVRKAVTLNCLYETSWWSYYIIFYWKQLPSKEMIFLIQGSDEQNA KSGRYSVNFKKAAKSVALTISALQLEDSAKYFCALGVLPTVTGGGLIFFGKGTTRVTVPEP NSQPHTKPSVFMKNGTNAVCLVKEFYPKDIRINLVSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAVKL GKYEDSNSVTCSVQHDKTVHSTDFEVKTDST (SEQ ID NO:8), или дельта-цепь, которая идентична ей на по крайней мере 88%.

6. Опухолеспецифический Т-клеточный рецептор (TCR) по любому из п.п. 1-5, в котором указанный CDR дополнительно или альтернативно включает или состоит из последовательности гамма-цепи, которая представляет собой CALWEVDYKCLF (SEQ ID NO:9); и/или последовательности дельта-цепи, которая представляет собой CALGEPVLFAVRGLIF (SEQ ID NO:10) и/или CACDLLGDRYTDKLIIF (SEQ ID NO:11); или CDR, который идентичен на по крайней мере 88% указанной последовательности гамма-цепи или указанной последовательности дельта-цепи.

7. Опухолеспецифический Т-клеточный рецептор (TCR) по любому из п.п. 1-6, который является растворимым.

8. Т-клетка, экспрессирующая указанный TCR по любому из п.п. 1-7.

9. Клон Т-клеток, экспрессирующий указанный TCR по любому из п.п. 1-7.

10. Клон Т-клеток по п. 9, который представляет собой клон SW.3G1.
11. Вектор, кодирующий TCR по любому из п.п. 1-7.
12. Фармацевтическая композиция, или иммуногенный агент, или биспецифическое средство, или вакцина, содержащая указанный TCR по любому из п.п. 1-7, или указанную клетку по п. 8, или указанный клон по п. 9 или 10, или указанный вектор по п. 11.
13. TCR по любому из п.п. 1-7, или указанная клетка по п. 8, или указанный клон по п. 9 или 10, или указанный вектор по п. 11, или указанная фармацевтическая композиция, или иммуногенный агент, или биспецифическое средство, или вакцина по п. 12 для применения при лечении рака.
14. TCR, клетка, клон, вектор, фармацевтическая композиция, иммуногенный агент, биспецифическое средство или вакцина по п. 13, причем указанный рак выбран из группы, включающей или состоящей из колоректального рака, рака легкого, почки, предстательной железы, мочевого пузыря, шейки матки, меланомы (кожи), рака кости, молочной железы, крови, головного мозга, поджелудочной железы, яичка, яичника, головы/шеи, печени, мочевого пузыря, щитовидной железы и матки.
15. Способ лечения рака, включающий введение указанного TCR по любому из п.п. 1-7, или указанной клетки по п. 8, или указанного клона по п. 9 или 10, или указанного вектора по п. 11, или указанной фармацевтической композиции, или иммуногенного агента, или биспецифического средства, или вакцины по п. 12 индивидууму, подлежащему лечению.
16. Способ по п. 15, в котором указанный рак выбран из группы, включающей или состоящей из колоректального рака, рака легкого, почки, предстательной железы, мочевого пузыря, шейки матки, меланомы (кожи), рака кости, молочной железы, крови, головного мозга, поджелудочной железы, яичка, яичника, головы/шеи, печени, мочевого пузыря, щитовидной железы и матки.
17. Способ по п. 15 или 16, в котором указанный TCR, клетку, клон, вектор, фармацевтическую композицию, иммуногенный агент, биспецифическое средство или вакцину вводят в комбинации с противоопухолевым средством.
18. Применение указанного TCR по любому из п.п. 1-7, или указанной клетки по п. 8, или указанного клона по п. 9 или 10, или указанного вектора по п. 11 для производства лекарственного средства для лечения рака.
19. Комбинированное терапевтическое средство для лечения рака, включающее:
 - а) указанный TCR по любому из п.п. 1-7, или указанную клетку по п. 8, или указанный клон по п. 9 или 10, или указанный вектор по п. 11, или указанную фармацевтическую композицию, или иммуногенный агент или биспецифическое средство, или вакцину по п. 12 в комбинации с
 - б) дополнительным противораковым терапевтическим средством.
20. TCR, или полипептид, или биспецифическое средство, или антитело, или фрагмент указанного антитела, который связывается с по крайней мере одной из изоформ продукта гена SCNNA1, показанных на фиг. 9.

21. TCR, или полипептид, или биспецифическое средство, или антитело, или фрагмент указанного антитела по п. 20, который связывается с экстраклеточным доменом указанной изоформы.

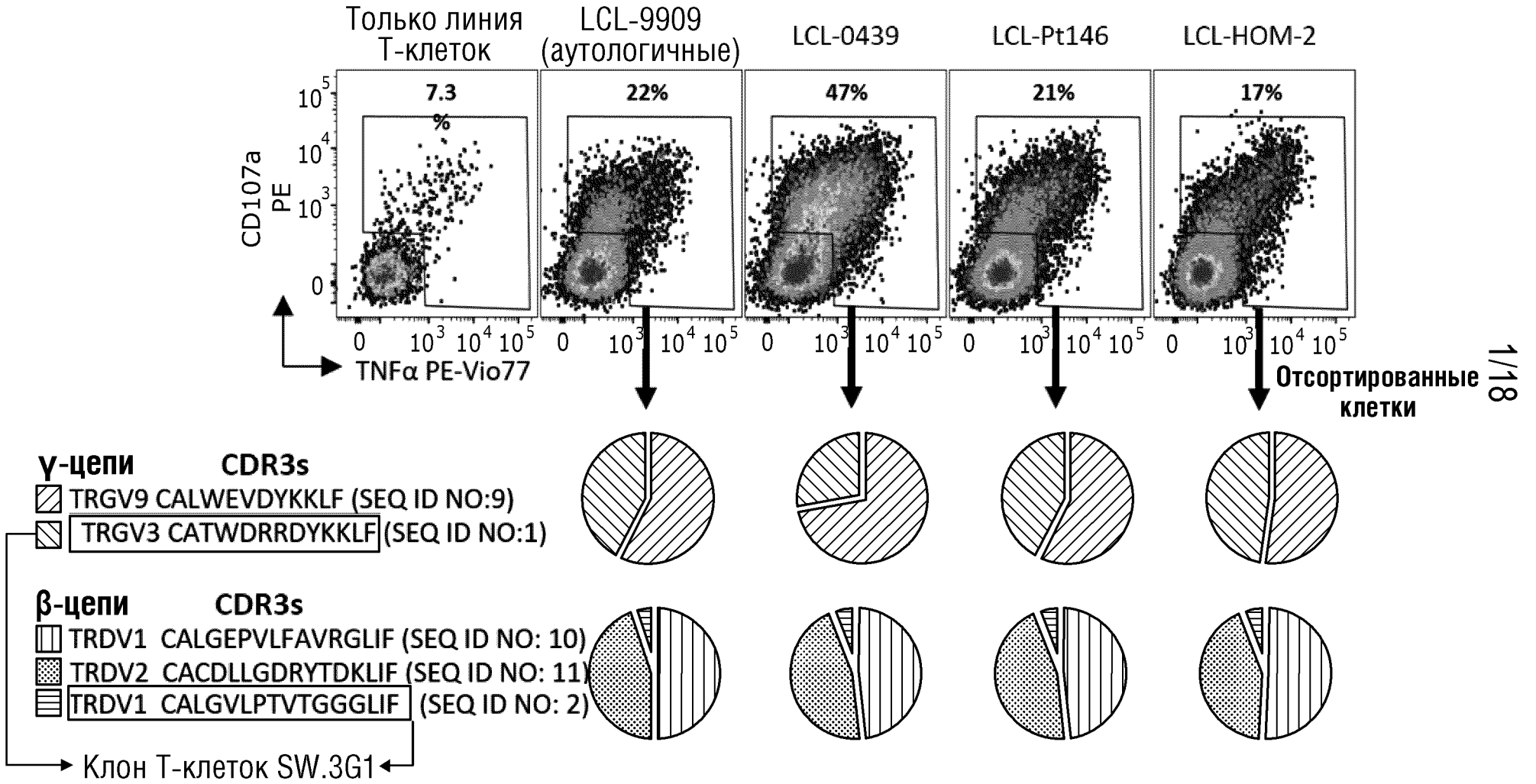
22. TCR, или полипептид, или биспецифическое средство, или антитело, или фрагмент указанного антитела по п. 20 или 21, причем указанное антитело является моноклональным.

23. По крайней мере одна изоформа продукта гена SCNNA1, показанная на фиг. 9, или ее фрагмент, который связывается с TCR по любому из п.п. 1-7.

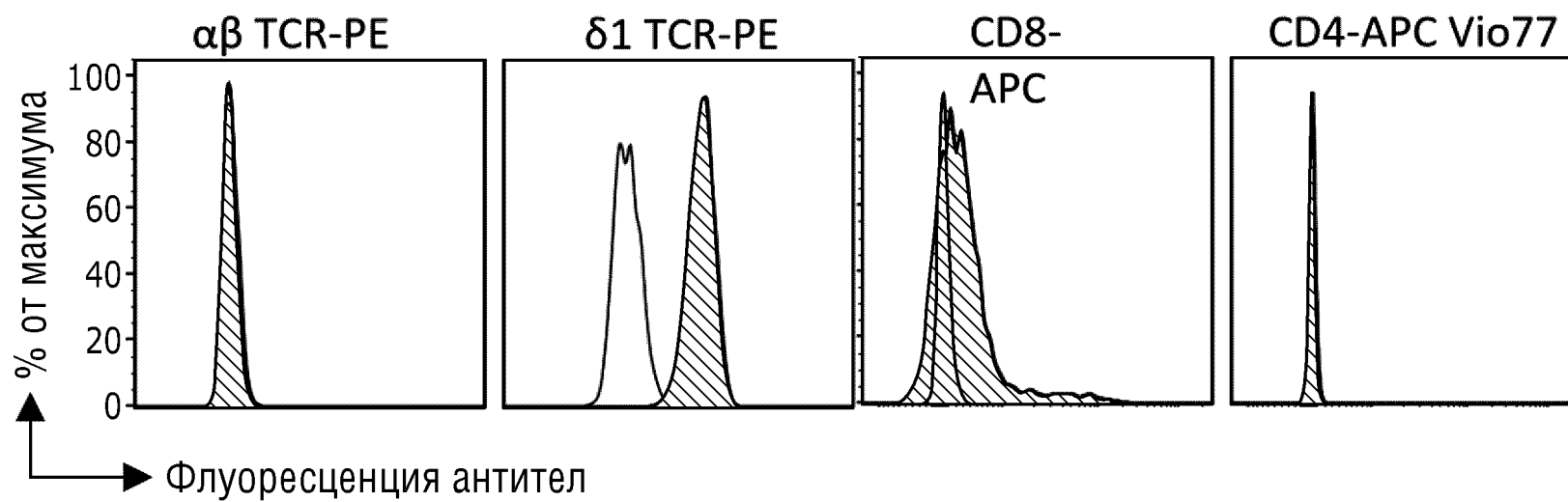
24. TCR, клетка, клон, вектор, фармацевтическая композиция, иммуногенный агент, биспецифическое средство, или вакцина, или полипептид, или антитело, или фрагмент указанного антитела, как в основном здесь описано.

По доверенности

ФИГ.1А



ФИГ.1В



ФИГ.2

Последовательность белка V γ 3-цепи клона SW.3G1

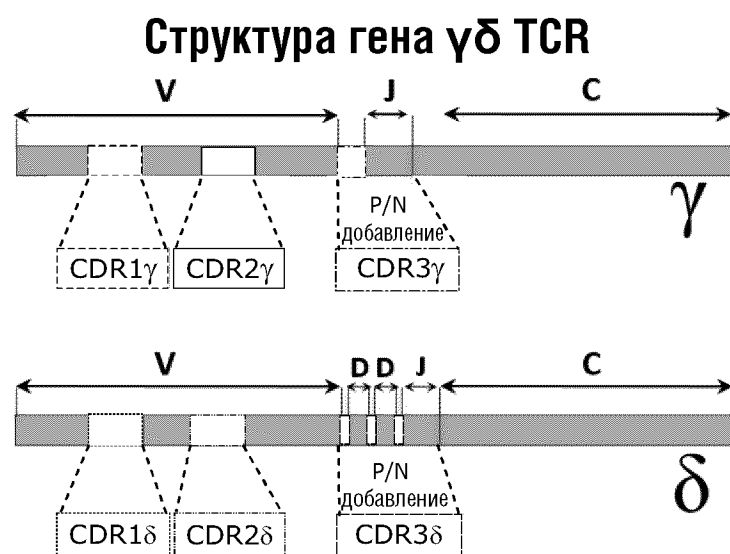
CDR-участки показаны жирным шрифтом с подчеркиванием и окрашены в разные цвета по всей фигуре

SSNLEGRTKSVTRQTGSSAEITCDLTVNTEFYIHWYLHQEGKAPQRLLYVDVSTARDVLEGLSPGKYTYHT
 PRRWSWILRLQNLINDSGVYYCATWDRRDYKKLFGSGTTLVTDKQLDADVSPKPTIFLPSIAETKLQKA
 GTYLCLEKFFPDVIKIHWQEKKSNTILGSQEGNTMKTNDTYMKFSWLTVPEKSLDKEHRCIVRHENKNG
 VDQEIIFPIKT (SEQ IN NO: 7)

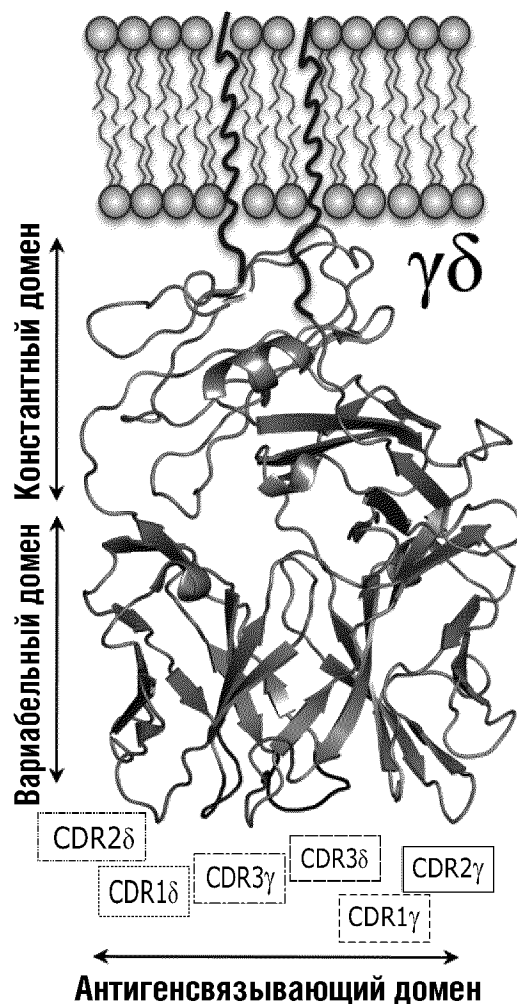
Последовательность белка V δ 1-цепи клона 3G1

CDR-участки показаны жирным шрифтом с подчеркиванием и окрашены в разные цвета по всей фигуре

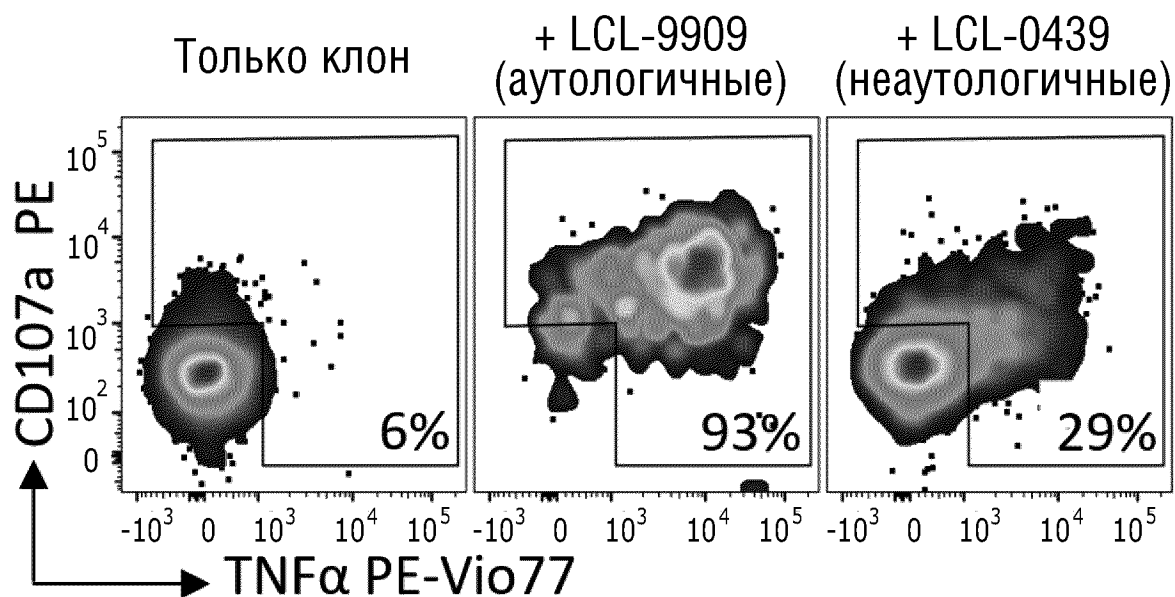
AQKVTQAQSSVSMRPVRKAVTLNCLYE^{TSWWSY}IFWYKQLPSKEMIFLIR^{QGS}DEQNAKSGRYSVNFKK
 AAKSVALTISALQLEDSAKYF^{CALGVLPTVTGGGLIF}GKGTRVTVEPNSQPHTKPSVFMKNGTNVACLVK
 EFYPKDIRINLVSSKITEFDPAIVISPSGKYNAVKLGKYEDSNSVTCSVQHDKTVHSTDFEVKTDST (SEQ
 ID NO: 8)



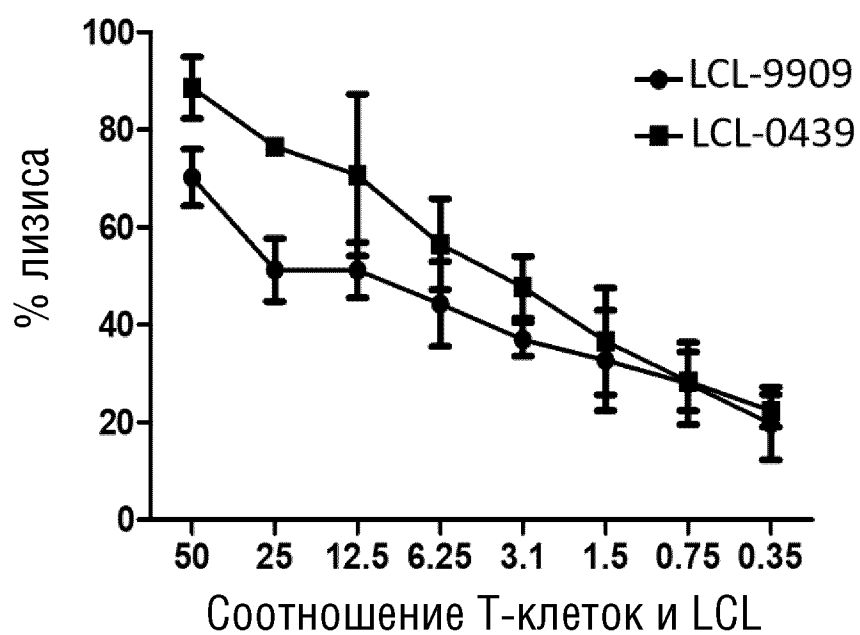
Структура белка $\gamma\delta$ TCR



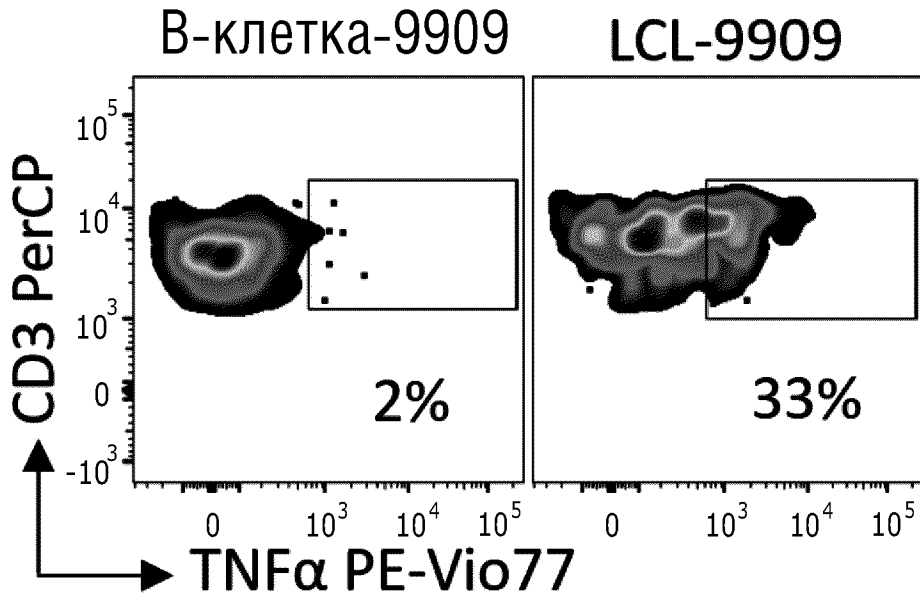
ФИГ.3А



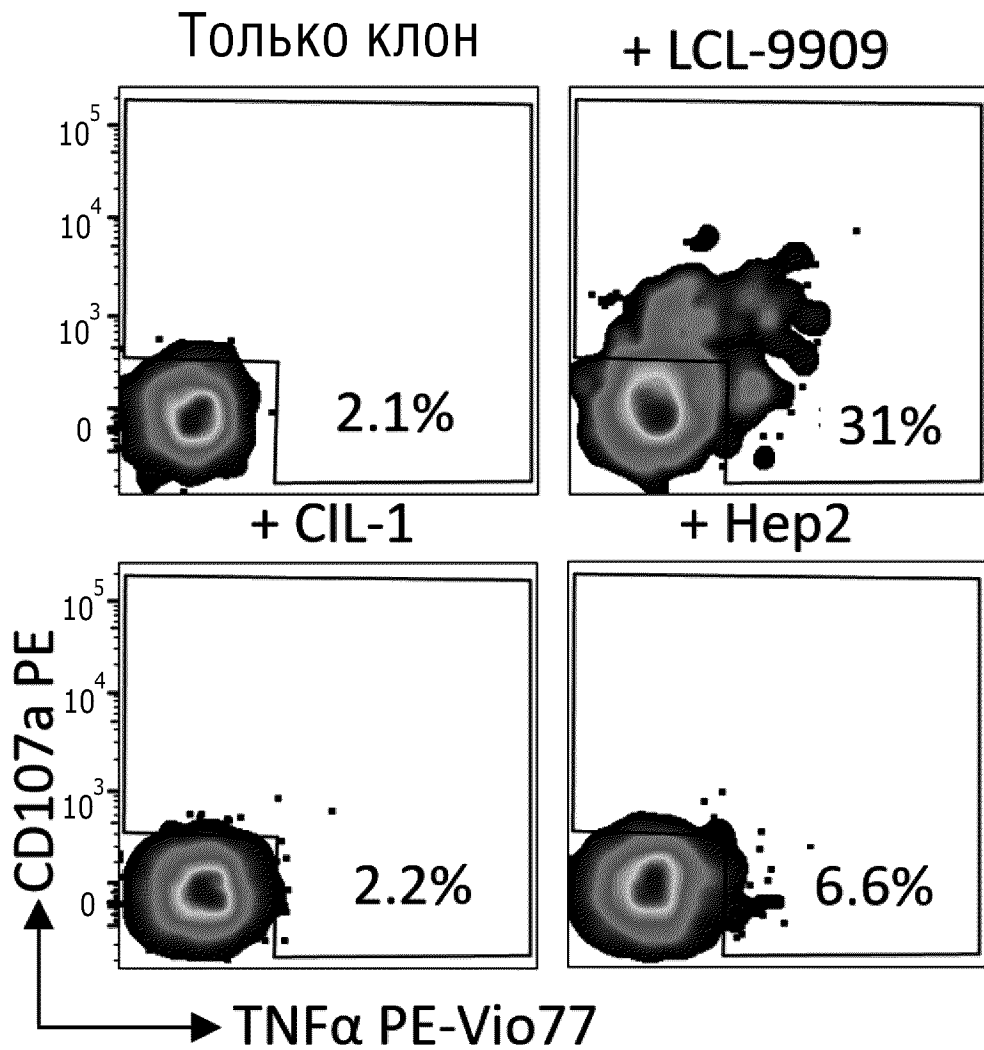
ФИГ.3В



ФИГ.3С



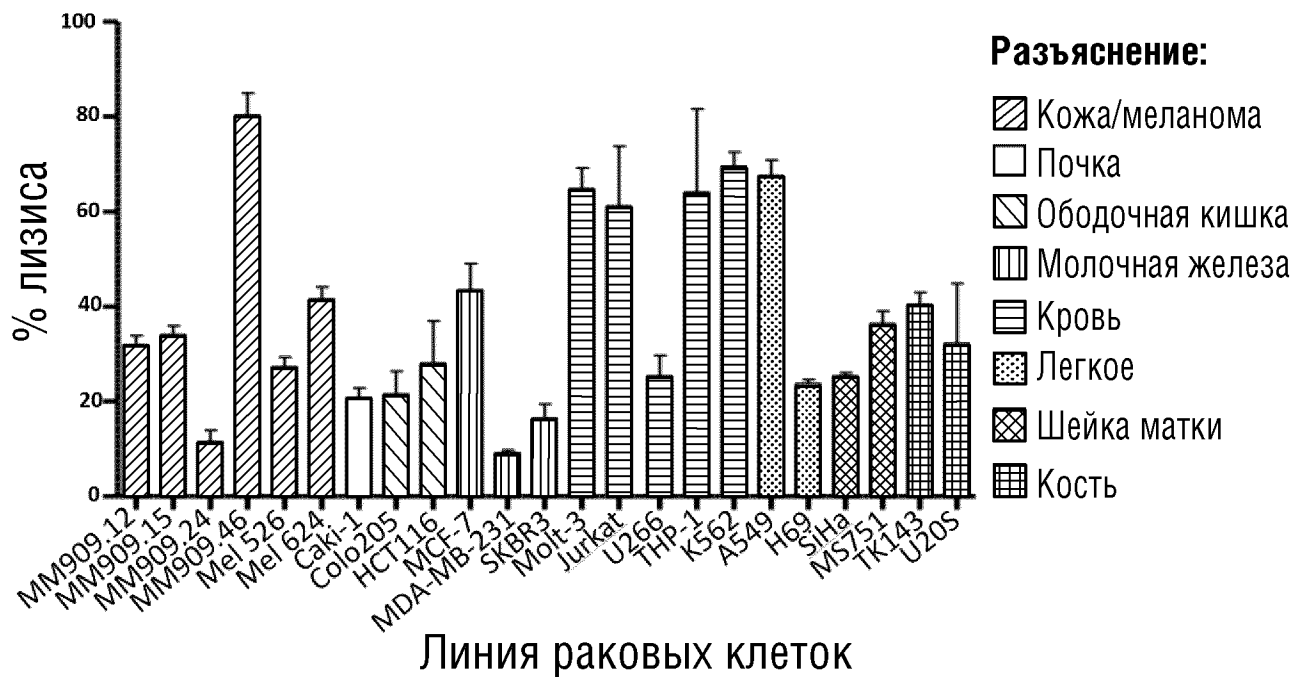
ФИГ.3D



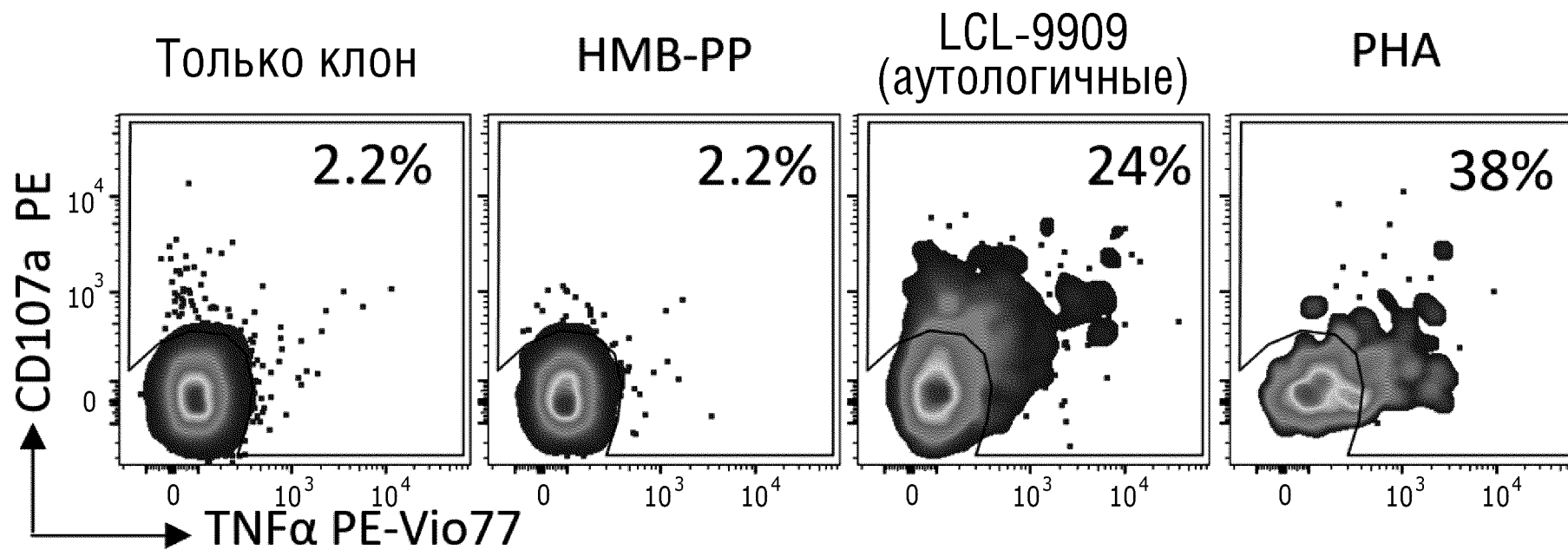
ФИГ.4А



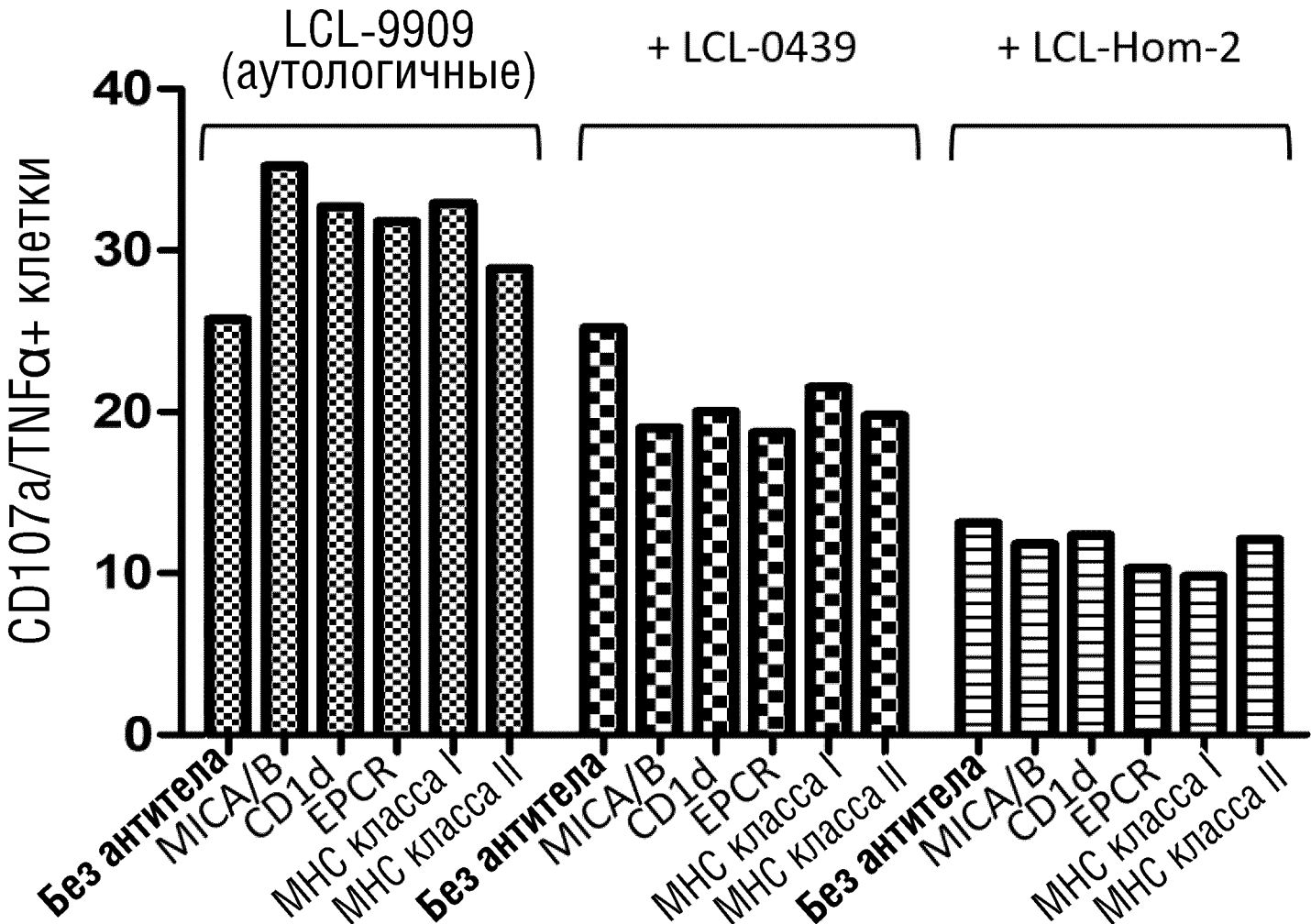
ФИГ.4В



ФИГ.5А



ФИГ.5В

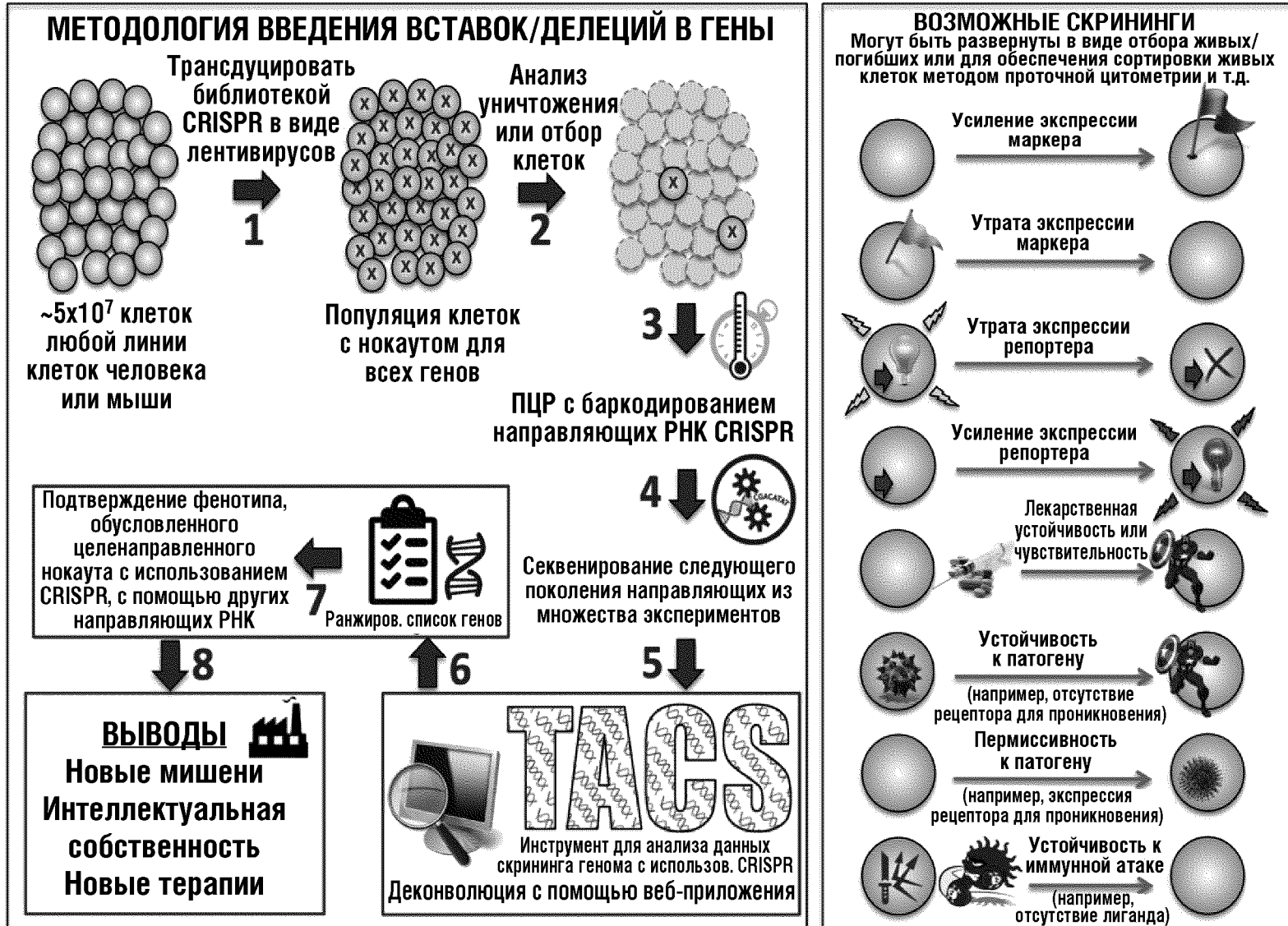


ФИГ.6

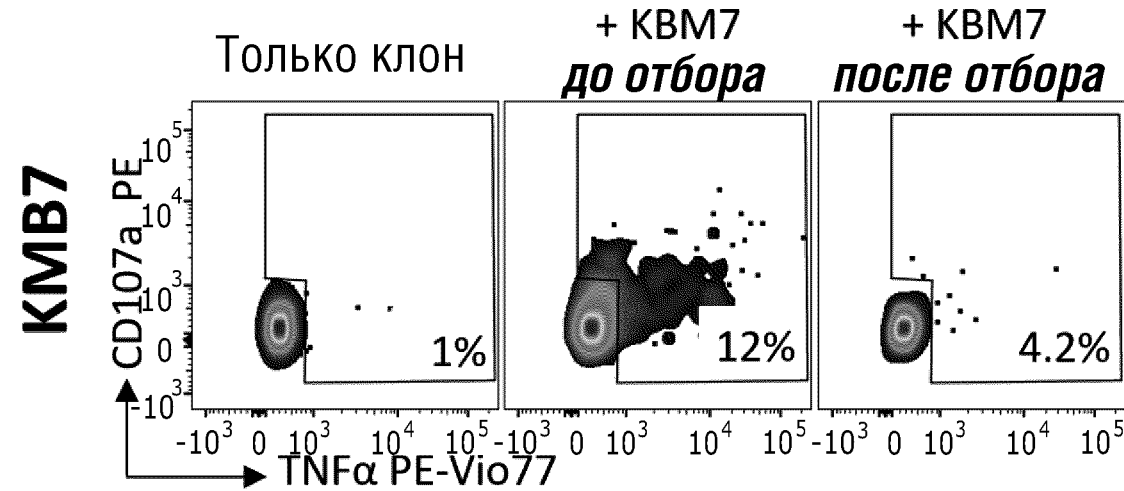
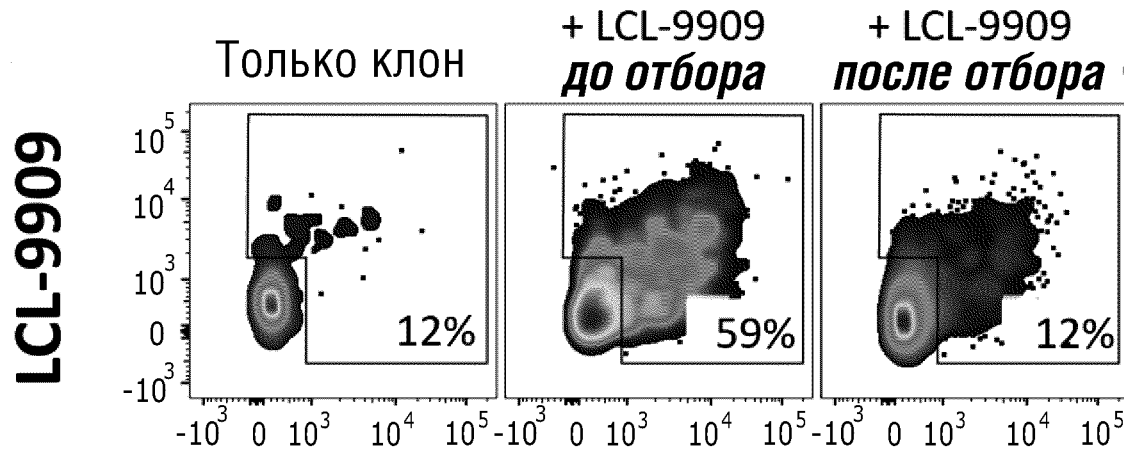
МОЩНОСТЬ СИСТЕМЫ CRISPR, ПРИМЕНЯЕМОЙ КО ВСЕМУ ГЕНОМУ

Предназначенные для скрининга всего генома библиотеки CRISPR в виде лентивирусов позволяют нокаутировать все гены в любой клеточной линии

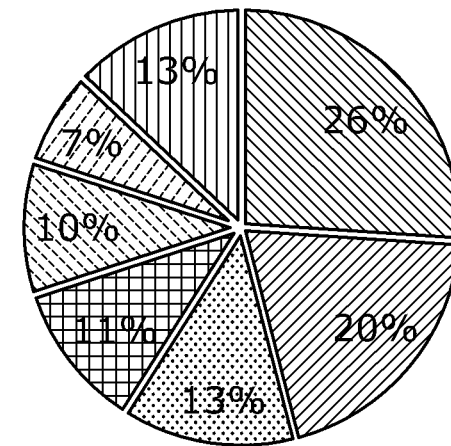
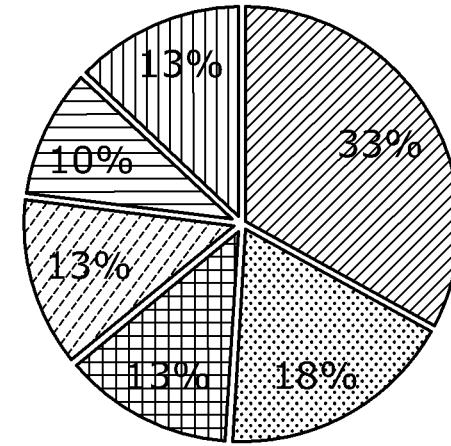
Простые стратегии отбора позволяют затем обнаружить все гены, связанные с данным процессом



ФИГ.7А




ФИГ.7В




ФИГ.7С

LCL-9909 и KMB7:

 Ген: **SCNN1A** (Натриевый канал/Эпителиальная 1 альфа-субъединица)
<http://www.uniprot.org/uniprot/P37088>


 Ген: **DTNB** (Дистробревин Бета)
<http://www.uniprot.org/uniprot/O60941>

 Ген: **NDUFV3** (субъединица V3 НАДН-убихиноноксидоредуктазы)
<http://www.uniprot.org/uniprot/P56181>


 Ген: **LRR1Q3** (содержащий 3 богатых лейцином повтора и IQ мотив)
<http://www.uniprot.org/uniprot/A6PVS8>


 Другие гены

LCL-9909:

 Ген: **MIR610** (микроРНК 610) **Homo sapiens (Hsa)**
<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR610>

KMB7:

 Ген: **ZYX** (Зиксин)
<http://www.uniprot.org/uniprot/Q15942>

 Ген: **NSUNS** (вероятная 28S рРНК (цитозин-С (5))-метилтрансфераза)
<http://www.uniprot.org/uniprot/Q96P11>

ФИГ.8

Псевдонимы гена : SCNN1A; BESC2; ENaCa; ENaCalpha; SCNEA; SCNN1.

Псевдонимы белка: альфа-ENaC-2, альфа-ENaC, альфа-NaCH, чувствительная к амилориду альфа-субъединица эпителиального натриевого канала; чувствительная к амилориду альфа-субъединица натриевого канала; чувствительная к амилориду субъединица альфа 2 натриевого канала; ENaC α ; субъединица альфа эпителиального Na(+) канала; субъединица альфа эпителиального Na(+) канала; FU21883; альфа-субъединица натриевого канала назального эпителия; субъединица альфа не потенциалуправляемого натриевого канала 1; SCNEA; SCNN1; альфа-субъединица натриевого канала, не потенциалуправляемого 1; альфа-субъединица натриевого канала, не потенциалуправляемого 1; альфа натриевого канала, не потенциалуправляемого 1.

Изоформы: описаны шесть изоформ варианта сплайсинга (**фиг. 9**). Идентификация с использованием универсального источника данных о белках (UniProt): P37088-1, -2, -3, -4, -5 и -6. Изоформа 1 считается канонической последовательностью и **использовалась для этого исследования**. Длина в аминокислотах длина и размер (кДа) для каждой соответствующей изоформы: 669/75704; 728/81856; 245/28328; 650/73603; 691/77980; 692/78234. Были описаны встречающиеся в природе варианты.

Антитела: PAS-29136: Кроличье поликлональное античеловеческое против остатков 272-555, PAS-35364: кроличье поликлональное против остатков 365-391, PA1-920A: кроличье поликлональное античеловеческое (перекрестно реагирует с мышинными и крысинными антигенами) против остатков, 20-42, и **было использовано для этого исследования**. OSR00124W: кроличье поликлональное античеловеческое против экстраклеточного домена.

Гомология с другими видами: 90% с другими приматами и 50% с мышами.

Фиг.9

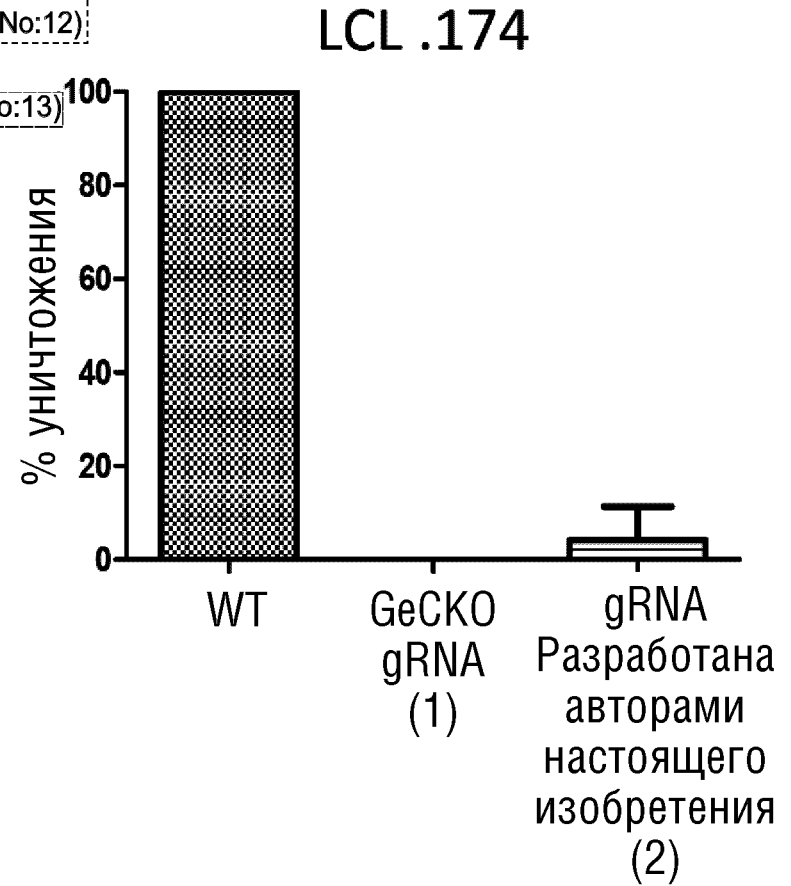
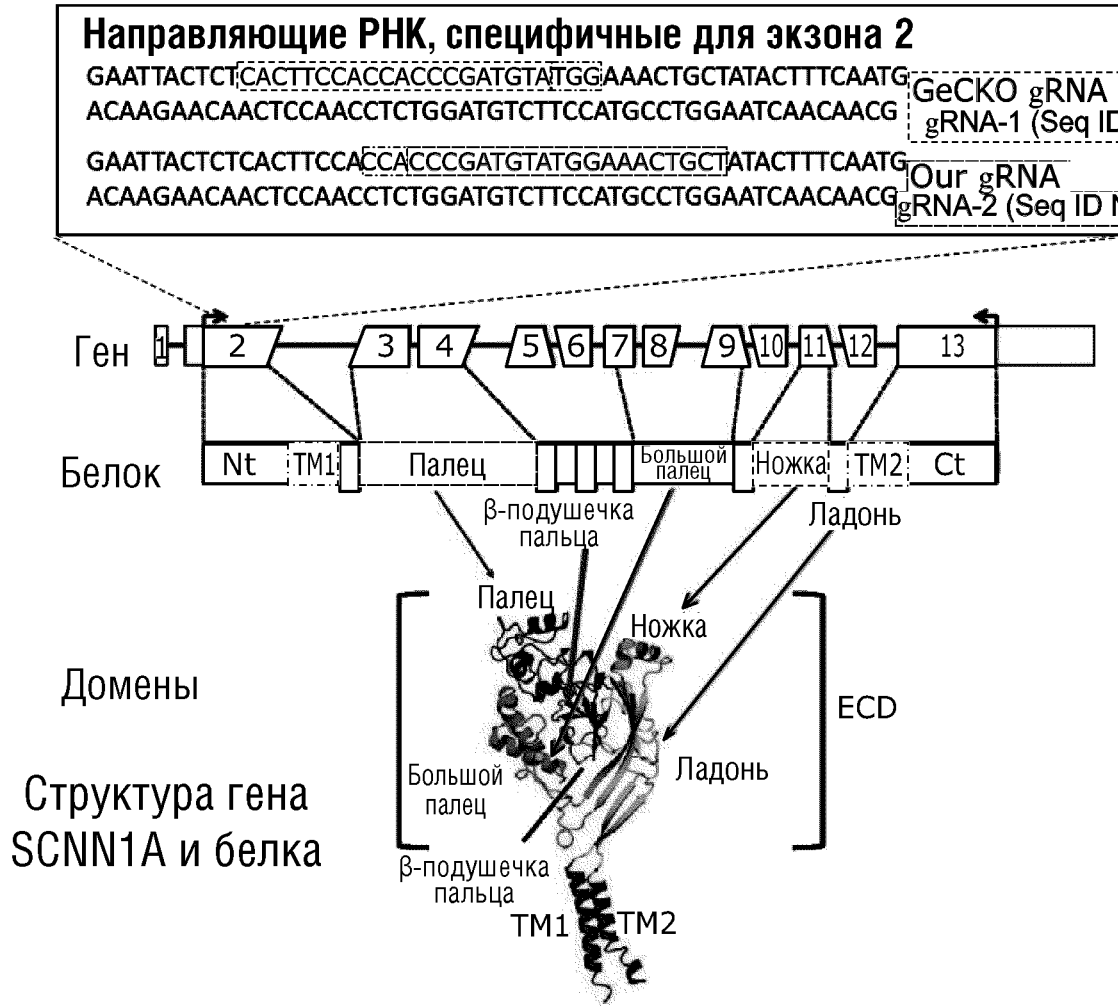
Изоформа 1	1	-----M	1
Изоформа 2	1	MGMARGSLTRVPGVMGEGTQGPESLDPDPCSPQSTPGLMKGNKLEEODPRPLQIPGLM	60
Изоформа 3	1	-----M	1
Изоформа 4	1	-----M	1
Изоформа 5	1	-----M	1
Изоформа 6	1	-----MSSIKGNKLEEODPRPLQIPGLM	24
	2	EGNKLEEODSSPPQSTPGLMKGNKREEQGLGPEPAAPQOPTAEEEEALIEFHRSYRELFEF	61
	61	EGNKLEEODSSPPQSTPGLMKGNKREEQGLGPEPAAPQOPTAEEEEALIEFHRSYRELFEF	120
	2	EGNKLEEODSSPPQSTPGLMKGNKREEQGLGPEPAAPQOPTAEEEEALIEFHRSYRELFEF	61
	2	EGNKLEEODSSPPQSTPGLMKGNKREEQGLGPEPAAPQOPTAEEEEALIEFHRSYRELFEF	61
	2	EGNKLEEODSSPPQSTPGLMKGNKREEQGLGPEPAAPQOPTAEEEEALIEFHRSYRELFEF	61
	25	EGNKLEEODSSPPQSTPGLMKGNKREEQGLGPEPAAPQOPTAEEEEALIEFHRSYRELFEF	84
	62	FCNNTTIHGAILRVCSQHNRMKTAFWAVLWLCFTFGMMYWQFGLLFGEYFSYPVSLNINLN	121
	121	FCNNTTIHGAILRVCSQHNRMKTAFWAVLWLCFTFGMMYWQFGLLFGEYFSYPVSLNINLN	180
	62	FCNNTTIHGAILRVCSQHNRMKTAFWAVLWLCFTFGMMYWQFGLLFGEYFSYPVSLNINLN	121
	62	FCNNTTIHGAILRVCSQHNRMKTAFWAVLWLCFTFGMMYWQFGLLFGEYFSYPVSLNINLN	121
	62	FCNNTTIHGAILRVCSQHNRMKTAFWAVLWLCFTFGMMYWQFGLLFGEYFSYPVSLNINLN	121
	85	FCNNTTIHGAILRVCSQHNRMKTAFWAVLWLCFTFGMMYWQFGLLFGEYFSYPVSLNINLN	144
	122	SDKLVFPAVTICTLNPYRYPEIKEELEELDRIEQTLFDLYKYSSFTTLVAGSRSRRDIF	181
	181	SDKLVFPAVTICTLNPYRYPEIKEELEELDRIEQTLFDLYKYSSFTTLVAGSRSRRDIF	240
	122	SDKLVFPAVTICTLNPYRYPEIKEELEELDRIEQTLFDLYKYSSFTTLVAGSRSRRDIF	181
	122	SDKLVFPAVTICTLNPYRYPEIKEELEELDRIEQTLFDLYKYSSFTTLVAGSRSRRDIF	181
	122	SDKLVFPAVTICTLNPYRYPEIKEELEELDRIEQTLFDLYKYSSFTTLVAGSRSRRDIF	181
	145	SDKLVFPAVTICTLNPYRYPEIKEELEELDRIEQTLFDLYKYSSFTTLVAGSRSRRDIF	204
	182	GTLPHPLQRLRVPPPPHGARRARSVASSLRDNNPQVDWKDWKIGFQLCNQNKSL--DCFYQ	239
	241	GTLPHPLQRLRVPPPPHGARRARSVASSLRDNNPQVDWKDWKIGFQLCNQNKSL--DCFYQ	298
	182	GTLPHPLQRLRVPPPPHGARRARSVASSLRDNNPQVDWKDWKIGFQLELLSLPDPVWKL	241
	182	GTLPHPLQRLRVPPPPHGARRARSVASSLRDNNPQVDWKDWKIGFQLCNQNKSL--DCFYQ	239
	182	GTLPHPLQRLRVPPPPHGARRARSVASSLRDNNPQVDWKDWKIGFQLCNQNKSL--DCFYQ	239
	205	GTLPHPLQRLRVPPPPHGARRARSVASSLRDNNPQVDWKDWKIGFQLCNQNKSL--DCFYQ	262
	240	TYSSGVDAVREWYRFHYINILSRLPETLPSLEEDTLGNFIFACRFNQVSCNQANYSHFHH	299
	299	TYSSGVDAVREWYRFHYINILSRLPETLPSLEEDTLGNFIFACRFNQVSCNQANYSHFHH	358
	242	LYFG-----	245
	240	TYSSGVDAVREWYRFHYINILSRLPETLPSLEEDTLGNFIFACRFNQVSCNQANYSHFHH	299
	240	TYSSGVDAVREWYRFHYINILSRLPETLPSLEEDTLGNFIFACRFNQVSCNQANYSHFHH	299
	263	TYSSGVDAVREWYRFHYINILSRLPETLPSLEEDTLGNFIFACRFNOVSCNOANYSHFHH	322
	300	PMYGNCYTFNDKNSNLWMSSMPGINNGLSLMLRAEQNDFIPLLSTVTGARVMVHGQDEP	359
	359	PMYGNCYTFNDKNSNLWMSSMPGINNGLSLMLRAEQNDFIPLLSTVTGARVMVHGQDEP	418
	246	-----VTGARVMVHGQDEP	245
	300	PMYGNCYTFNDKNSNLWMSSMPGINN-----VTGARVMVHGQDEP	340
	300	PMYGNCYTFNDKNSNLWMSSMPGINNGLSLMLRAEQNDFIPLLSTVTGARVMVHGQDEP	359

ФИГ.9 (продолжение)

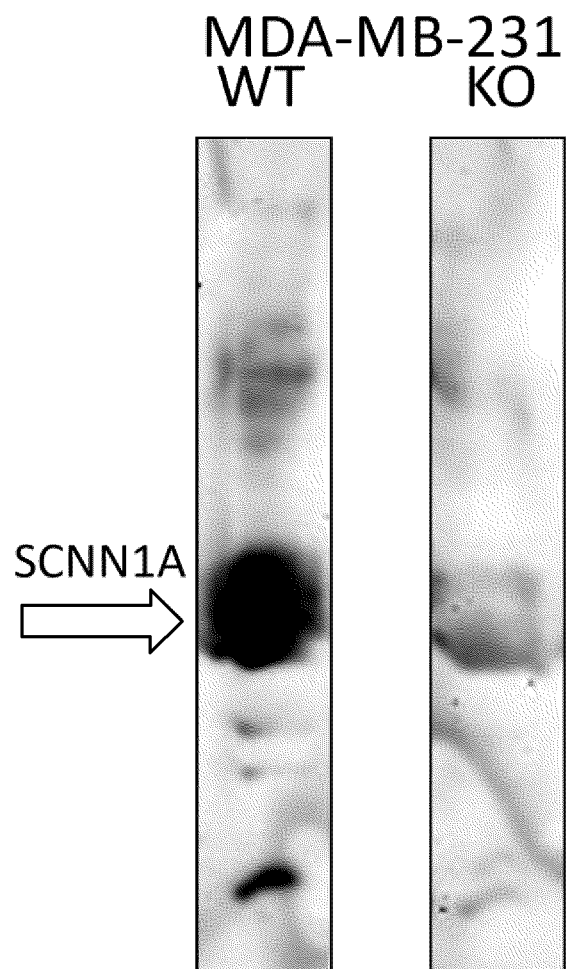
323 PMYGNCYTFNDKNNNSNLWMSMPGINNGLSLMLRAEQNDFIPLLSTVTGARVMVHGQDEP 382
 360 AFMDDGGFNLRPGVETSISMRKETLDRLGGDYGDCTKNGSDVPEVENLYPSKYTQQVCIHS 419
 419 AFMDDGGFNLRPGVETSISMRKETLDRLGGDYGDCTKNGSDVPEVENLYPSKYTQQVCIHS 478
 246 ----- 245
 341 AFMDDGGFNLRPGVETSISMRKETLDRLGGDYGDCTKNGSDVPEVENLYPSKYTQQVCIHS 400
 360 AFMDDGGFNLRPGVETSISMRKETLDRLGGDYGDCTKNGSDVPEVENLYPSKYTQQVCIHS 419
 383 AFMDDGGFNLRPGVETSISMRKETLDRLGGDYGDCTKNGSDVPEVENLYPSKYTQQVCIHS 442
 420 CFQESMIKECGCAYIFYPRPQONVEYCDYRKHSSWG-----YCY 457
 479 CFQESMIKECGCAYIFYPRPQONVEYCDYRKHSSWG-----YCY 516
 246 ----- 245
 401 CFQESMIKECGCAYIFYPRPQONVEYCDYRKHSSWG-----YCY 438
 420 CFQESMIKECGCAYIFYPRPQONVEYCDYRKHSSWGQVRSLTPVIPALWEAEAGGSRGYCY 479
 443 CFOESMIKECGCAYIFYPRPONVEYCDYRKHSSWG-----YCY 480
 458 YKLQVDFSSDHLGCF TKCRKPCSVTSYQLSAGYSRWPSVTSQEWVFQMLSRQNNYTVNNK 517
 517 YKLQVDFSSDHLGCF TKCRKPCSVTSYQLSAGYSRWPSVTSQEWVFQMLSRQNNYTVNNK 576
 246 ----- 245
 439 YKLQVDFSSDHLGCF TKCRKPCSVTSYQLSAGYSRWPSVTSQEWVFQMLSRQNNYTVNNK 498
 480 YKLQVDFSSDHLGCF TKCRKPCSVTSYQLSAGYSRWPSVTSQEWVFQMLSRQNNYTVNNK 539
 481 YKLQVDFSSDHLGCF TKCRKPCSVTSYQLSAGYSRWPSVTSQEWVFQMLSRQNNYTVNNK 540
 518 RNGVAKVNIFFKELNYKTNSESPSVTMVTLLSNLGSQWSLWFGSSVLSVVEMAELVFDLL 577
 577 RNGVAKVNIFFKELNYKTNSESPSVTMVTLLSNLGSQWSLWFGSSVLSVVEMAELVFDLL 636
 246 ----- 245
 499 RNGVAKVNIFFKELNYKTNSESPSVTMVTLLSNLGSQWSLWFGSSVLSVVEMAELVFDLL 558
 540 RNGVAKVNIFFKELNYKTNSESPSVTMVTLLSNLGSQWSLWFGSSVLSVVEMAELVFDLL 599
 541 RNGVAKVNIFFKELNYKTNSESPSVTMVTLLSNLGSQWSLWFGSSVLSVVEMAELVFDLL 600
 578 VIMFLMLLLRRFRSRYWSPGRGGRGAQEVASTLASSPPSHFC|PHPMSLSLSQPGPAPSPAL 637
 637 VIMFLMLLLRRFRSRYWSPGRGGRGAQEVASTLASSPPSHFC|PHPMSLSLSQPGPAPSPAL 696
 246 ----- 245
 559 VIMFLMLLLRRFRSRYWSPGRGGRGAQEVASTLASSPPSHFC|PHPMSLSLSQPGPAPSPAL 618
 600 VIMFLMLLLRRFRSRYWSPGRGGRGAQEVASTLASSPPSHFC|PHPMSLSLSQPGPAPSPAL 659
 601 VIMFLMLLLRRFRSRYWSPGRGGRGAQEVASTLASSPPSHFC|PHPMSLSLSQPGPAPSPAL 660
 638 TAPPPAYATLGPRPSPGGSAGASSST|CPLGGP 669
 697 TAPPPAYATLGPRPSPGGSAGASSST|CPLGGP 728
 246 ----- 245
 619 TAPPPAYATLGPRPSPGGSAGASSST|CPLGGP 650
 660 TAPPPAYATLGPRPSPGGSAGASSST|CPLGGP 691
 661 TAPPPAYATLGPRPSPGGSAGASSST|CPLGGP 692

ФИГ.10А

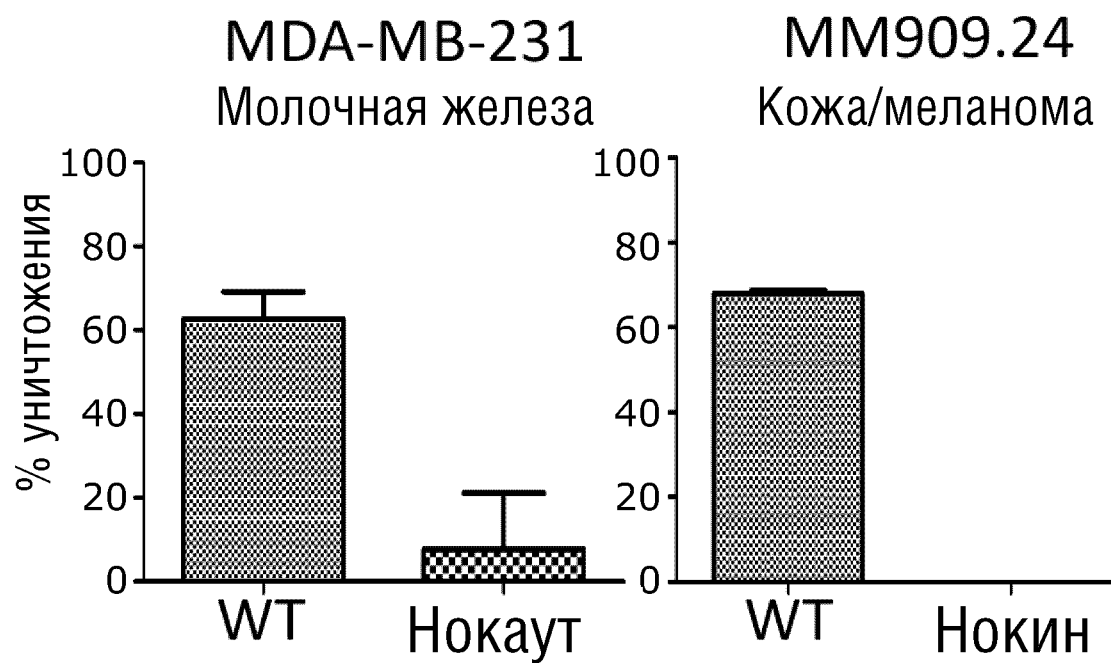
ФИГ.10В



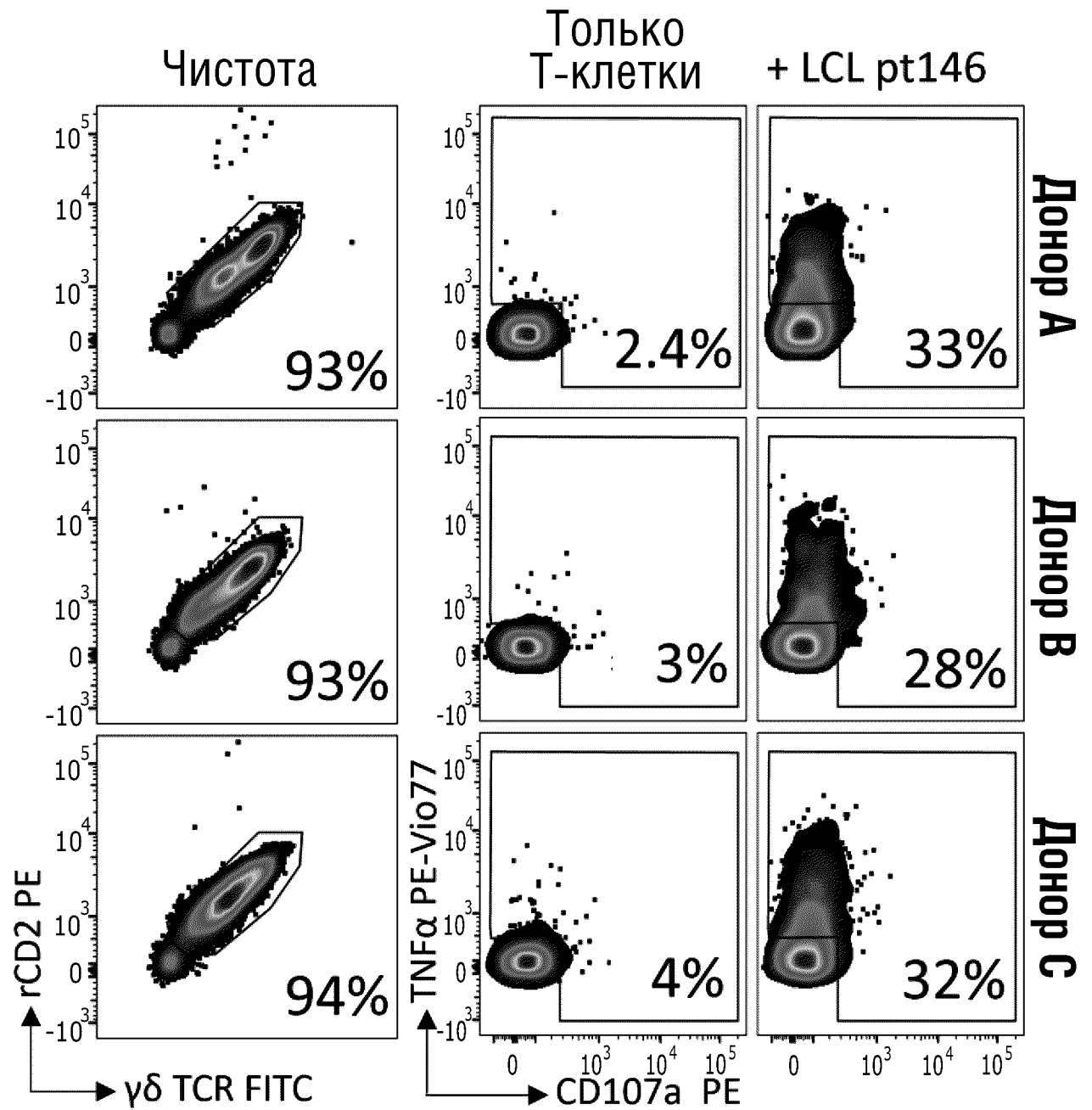
ФИГ.10С



ФИГ.10D



ФИГ.11А



ФИГ.11В

LCL.174 мишени

