

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202190770 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.06.23

(22) Дата подачи заявки
2019.09.13

(51) Int. Cl. *G01N 33/50* (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
C07K 14/74 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) СПОСОБ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СКРИНИНГА НА ПЕПТИДЫ С АФФИННОСТЬЮ К МОЛЕКУЛАМ МНС КАК ЛИГАНДОВ ТКР

(31) 62/731,337; 10 2018 122 546.6;
62/873,102

(32) 2018.09.14; 2018.09.14; 2019.07.11

(33) US; DE; US

(86) PCT/EP2019/074511

(87) WO 2020/053398 2020.03.19

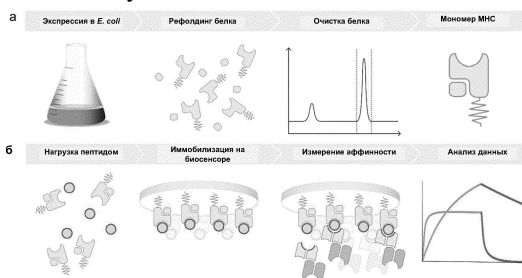
(88) 2020.12.17

(71) Заявитель:
ИММАТИКС БАЙОТЕКНОЛОДЖИЗ
ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:
Моритц Андреас, Маурер Доминик,
Бунк Себастиан, Вагнер Клаудиа (DE)

(74) Представитель:
Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М.,
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,
Джермакян Р.В. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способу высокопроизводительного скрининга на комплексы связывающихся с ТКР пептидных лигандов с молекулами МНС, включающему стабилизированные комплексы пептида и молекулы МНС и соответствующие виды применения указанного способа. Настоящее изобретение также относится к полипептидам, включающим или состоящим из стабилизированных молекул МНС или их фрагментов, связывающихся с пептидом, фармацевтическим композициям, включающим указанные полипептиды, вакцинам, включающим указанную фармацевтическую композицию, и видам применения указанной вакцины для получения лекарственного средства и/или для предупреждения раковых заболеваний. Настоящее изобретение относится также к нуклеиновым кислотам, кодирующим указанные полипептиды, и векторам, включающим указанные нуклеиновые кислоты.



A1

202190770

202190770

A1

Способ высокопроизводительного скрининга на пептиды с аффинностью к молекулам МНС как лигандов ТКР

Настоящее изобретение относится к способу высокопроизводительного скрининга на комплексы связывающихся с ТКР пептидных лигандов с молекулами МНС, включающему стабилизированные комплексы пептида и молекулы МНС и соответствующие виды применения указанного способа. Настоящее изобретение также относится к полипептидам, включающим или состоящим из стабилизированных молекул МНС или их фрагментов, связывающихся с пептидом, фармацевтическим композициям, включающим указанные полипептиды, вакцинам, включающим указанную фармацевтическую композицию, и видам применения указанной вакцины для получения лекарственного средства и/или для предупреждения раковых заболеваний. Настоящее изобретение относится также к нуклеиновым кислотам, кодирующим указанные полипептиды, и векторам, включающим указанные нуклеиновые кислоты.

Уровень техники

Презентация пептидов на клеточной поверхности молекулами МНС играет фундаментальную роль в иммунном ответе на вирусную инфекцию или раковую опухоль (1). Молекулы МНС I класса представляют собой тримерные комплексы, состоящие из полиморфной тяжелой цепи, бета-2 микроглобулина (β_2m) и пептидного лиганда, типичная длина которого составляет 8–10 аминокислот, образованные в результате деградации цитозольных белков. Т-клетки способны распознавать специфические комплексы пептида и молекулы МНС (рМНС) с помощью рецептора (ТКР) своего специфического клона Т-клеток и вызывать иммунный ответ.

Получение растворимых комплексов рМНС важно для различных видов применения в научной и клинической сферах, которые сфокусированы на взаимодействии между рМНС и ТКР. Впервые они были получены в 1992 году с помощью методов экспрессии и рефолдинга белков и с тех пор нашли многочисленные виды применения, например, для идентификации антиген-специфических Т-клеток при помощи проточной цитометрии или измерения аффинности взаимодействия между ТКР и комплексом рМНС (2–5).

Аффинность ТКР по отношению к родственному комплексу рМНС имеет существенное влияние на функциональность экспрессирующей Т-клетки (6). Таким образом, были сделаны попытки улучшения аффинности низкоаффинных ТКР, чтобы достичь оптимальных уровней для клинического применения (7). Многочисленные эксперименты по созреванию позволили получить ТКР с пикомолярной аффинностью, в диапазоне, обычно присущем антителам. Они связываются с рМНС-мишенями с длительными полупериодами взаимодействия даже в мономерной форме, и поэтому они привлекли внимание в качестве компонента, привлекающего опухолевые клетки, в рамках форматов с биспецифическими активаторами Т-клеток (8, 9).

В патентной заявке WO 2013/030620 раскрыты рекомбинантные молекулы МНС I класса, которые вырабатываются бактериями, и которые присутствуют в качестве нерастворимого тельца-включения для выявления эпитоп-специфических ЦТЛ. Их предварительно денатурируют в растворе хаотропного средства. Затем хаотропное средство удаляют в присутствии желаемого пептида (ренатурация, рефолдинг), и пептидный комплекс I класса отделяют от неструктурированного белка с помощью гель-фильтрации. В патентной заявке WO 2013/030620 представлен ген для кодирования молекулы МНС I класса, причем молекула МНС I класса имеет альфа-1-спираль и альфа-2-спираль, и ген кодируется таким образом, что в молекуле МНС I класса образуется связь между альфа-1-спиралью и альфа-2-спиралью. Таким образом, может быть предложен комплект для анализа относительного содержания Т-клеток. Аминокислота 139 замещена цистеином с получением Cys-139, аминокислота 84 замещена цистеином с получением Cys-84 или аминокислота 85 замещена цистеином с получением Cys-85, дисульфидный мостик образован в тяжелой цепи молекулы МНС I класса между альфа-1-спиралью и альфа-2-спиралью между Cys-139 и Cys-84 или между Cys-139 и Cys-85.

В патентной заявке США 2009-0117153 раскрыта так называемая «дисульфидная ловушка», включающая антигенный пептид, ковалентно связанный с тяжелой цепью молекулы МНС I класса дисульфидной связью, образованной между двумя остатками цистеина. В некоторых конфигурациях дисульфидная ловушка, такая как одноцепочечный тример с дисульфидной ловушкой (dtSCT), может включать одну цепь из смежных полипептидов. При синтезе внутри клетки дисульфидная ловушка

окисляются надлежащим образом в ЭР и может быть распознана Т-клетками. В некоторых конфигурациях пептидный компонент дисульфидной ловушки не вытесняется пептидами-конкурентами с высокой аффинностью даже при довольно слабой связи этого пептида с тяжелой цепью. В различных конфигурациях дисульфидная ловушка может быть использована для вакцинации, стимуляции образования CD8 Т-клеток, а в случае поливалентных реактивов на основе МНС/пептид – для определения числа и отслеживания Т-клеток. Также предложены нуклеиновые кислоты, включающие последовательность, кодирующую дисульфидную ловушку. Такие нуклеиновые кислоты, которые могут быть векторами ДНК, могут применяться в качестве вакцин.

В работе Zeynep Hein и соавт. (в: Peptide-independent stabilization of MHC class I molecules breaches cellular quality control. J Cell Sci 2014 127: 2885-2897) описан вариант мышинового МНС-класса I Н-2Кb, в котором спирали $\alpha 1$ и $\alpha 2$ связаны между собой дисульфидной связью вблизи F-кармана, что ограничивает их подвижность. Дисульфидная связь С84–С139 допускает нормальное взаимодействие пептид-нагружающего комплекса (PLC) и презентацию антигена, однако делает экспрессию молекул МНС-I на поверхности ТАР- и тапазин-независимой, ускоряет антероградный транспорт и в высокой степени снижает скорость эндоцитоза МНС-I.

В патентной заявке WO 2011/101681 раскрыты рекомбинантные молекулы МНС II класса, стабилизированные дисульфидной связью, которые связаны с помощью дисульфидной связи между остатками цистеина, находящимися в домене $\alpha 2$ указанной α -цепи и в домене $\beta 2$ указанной β -цепи, причем указанные остатки цистеина не присутствуют в доменах $\alpha 2$ и $\beta 2$ встречающихся в природе молекул МНС II класса.

В патентной заявке WO 2018/029350 раскрыт анализ скорости K_{on} и усовершенствованный анализ скорости K_{off} для лигандов ТКР, который может применяться более широко за счет новой комбинации с технологией пептидного обмена под воздействием УФ. Данное раскрытие позволяет провести на «высокопроизводительном» уровне анализ скорости K_{off} мономеров МНС, что впоследствии может быть использовано для скрининга ТКР-кандидатов для получения расширенных пептидных библиотек с использованием таких анализов,

как анализ скорости K_{off} лигандов ТКР, что не было возможным ранее. Более того, проведение пептидного обмена под воздействием УФ с анализом скорости K_{off} мономеров МНС позволяет проведение анализа ТКР-кандидатов, распознающих специфические пептиды, несущие аминокислоту цистеин, что ранее могло бы препятствовать или даже сделать невозможным измерение скорости K_{off} .

В работе Newell и соавт. (в: Newell EW, "Higher Throughput Methods of Identifying T Cell Epitopes for Studying Outcomes of Altered Antigen Processing and Presentation." *Frontiers in Immunology*. 2013; 4:430) раскрыт способ комбинаторного окрашивания тетрамерами пептид-МНС с высоким содержанием с применением цитометрии. В работе Bakker и соавт. (в: Bakker AH, Hoppes R, Linnemann C, et al., "Conditional MHC class I ligands and peptide exchange technology for the human MHC gene products HLA-A1, -A3, -A11, and -B7."

PNAS 2008; 105(10):3825-3830) раскрыты активные при определенных условиях лиганды, которые диссоциируют под воздействием длинноволновых УФ лучей, и которые могут быть сконструированы для молекулы МНС HLA-A2 человека. Данная технология пептидного обмена, предположительно, может быть развита до общеприменимого подхода для высокопроизводительных видов применения на основе молекул МНС для анализа иммунитета, опосредованного цитотоксическими Т-клетками. Cochran и Stern (в: "A diverse set of oligomeric class II MHC-peptide complexes for probing T-cell receptor interactions." *Chem Biol*. 2000 Sep;7(9):683-96) раскрывают инструменты для изучения молекулярных механизмов, отвечающих за запуск активационных процессов в Т-клетках.

За счет изменения местонахождения введенного остатка цистеина и числа и пространственного размещения сульфгидрильных активных групп, находящихся на новых и имеющихся в продаже реагентах для поперечной сшивки, был получен топологически разнообразный набор олигомеров белка HLA-DR1 МНС человека, варьирующихся по размеру от димеров до тетрамеров. Флуоресцентные зонды, встроенные в реагенты для поперечной сшивки, упрощали измерение связывания олигомеров с поверхностью Т-клеток. Олигомерные комплексы МНС-пептид, включая различные димеры, тримеры и тетрамеры МНС, связывались с Т-клетками и вызывали процессы активации Т-клеток антиген-специфическим образом.

В работе Chong и соавт. (в: “High-throughput and Sensitive Immunopeptidomics Platform Reveals Profound Interferon- γ -Mediated Remodeling of the Human Leukocyte Antigen (HLA) Ligandome.” *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*. 2018;17(3):533-548) раскрыт высокопроизводительный, воспроизводимый и чувствительный способ последовательной иммуно-аффинной очистки пептидов HLA-I и -II из вплоть до 96 образцов с использованием планшетного формата, применимого как для линий клеток, так и для тканей. Этот способ направлен на усовершенствование, предположительно, наиболее критичного этапа в технологическом процессе иммунопептидомики – подготовки образцов, поскольку этим определяется общий выход пептида и воспроизводимость.

Luimstra и соавт. (в: Luimstra JJ, Garstka MA, Roex MCJ, et al. “A flexible MHC class I multimer loading system for large-scale detection of antigen-specific T cells.” *J Exp Med* 2018; 215(5):1493-1504) раскрывают, как утверждается, простой, быстрый, гибкий и эффективный способ получения множества различных мультимеров МНС I класса (МНС I) одновременно при использовании опосредованного температурой пептидного обмена. Ими были сконструированы активные при определенных условиях пептиды для HLA-A*02:01 и H-2K^b, формирующие устойчивые комплексы пептид–МНС I при низких температурах, которые однако диссоциируют под воздействием определенной повышенной температуры. Получаемые в результате комплексы с молекулами МНС I, активные при определенных условиях, сами по себе или после обработки до готовых к применению мультимеров, могут быть быстро нагружены на интересующие пептиды без дополнительных действий и в течение короткого промежутка времени.

Потенциальный недостаток усиления аффинности ТКР – это введение нецелевой токсичности. В связи с присущим ТКР перекрестным взаимодействием у них может развиваться неконтролируемое повышение аффинности в равной степени по отношению к другим комплексам рМНС (10). О многочисленных подобных случаях уже сообщалось в рамках клинических исследований (11 – 13).

Поэтому всеобъемлющий скрининг необходим не только для гарантии эффективности, но и специфичности и безопасности лекарственных препаратов-кандидатов (14). Эта задача связана с большими сложностями в связи с установленным на данный момент размером иммунопептидома, охватывающем не

менее 150 000 лигандных пептидов МНС I класса, идентифицированных с помощью масс-спектрометрии, и имеющих в распоряжении способов получения рМНС (15).

Крупномасштабное создание библиотек рМНС и последующее проведение высокопродуктивных скринингов ТКР на связывание, например, для получения связывающего мотива или для непосредственной идентификации и характеристики потенциально перекрестно реагирующих пептидов, осуществить до сих пор сложно при использовании таких распространенных технологий уровня техники, как описанные выше. Сложность распространяется также на получение высококачественных комплексов рМНС даже в небольшом количестве для отдельных лиц или организаций без необходимости использования технически сложных мощностей по получению комплексов рМНС, например, для производства в сжатые сроки на заказ в клинических условиях. Поэтому задачей настоящего изобретения является предложить улучшенные стратегии в данной области. Другие задачи и аспекты настоящего изобретения станут очевидными для специалиста данной области при прочтении последующего описания изобретения.

В соответствии с его первым аспектом указанная выше задача решена предложением способа скрининга на комплексы связывающегося с ТКР пептидного лиганда и молекулы МНС (рМНС), включающего этапы:

- а) обеспечения стабилизированной подходящим образом молекулы МНС, где указанная молекула МНС включает по меньшей мере один искусственно введенный ковалентный мостик:
 - (i) между аминокислотами альфа-1-домена и аминокислотами альфа-2-домена указанной стабилизированной молекулы МНС в случае МНС I; и/или
 - (ii) между двумя аминокислотами альфа-1-домена указанной стабилизированной молекулы МНС в случае МНС I; или
 - (iii) между двумя аминокислотами альфа-1-домена или двумя аминокислотами бета-1-домена указанной стабилизированной молекулы МНС в случае МНС II; и/или
 - (iv) между одной аминокислотой альфа-1-домена и одной аминокислотой бета-1-домена указанной стабилизированной молекулы МНС в случае МНС II;

- б) контактирования указанной стабилизированной подходящим образом молекулы МНС с множеством ее пептидных лигандов в целях получения комплексов пептидного лиганда и молекулы МНС (pМНС), и
- в) скрининг указанных комплексов молекулы pМНС на наличие связывания с ТКР.

Предпочтительным является способ в соответствии с изобретением, в котором указанная стабилизированная молекула МНС включает по меньшей мере один искусственно введенный ковалентный дисульфидный мостик между двумя аминокислотами, более предпочтительно по меньшей мере один искусственно введенный ковалентный дисульфидный мостик между аминокислотами между α -спиралями, например, за счет (i) мутации аминокислоты в положении 84, тирозина в большинстве HLA (см. Фиг. 13), и аминокислоты в положении 139, аланина в большинстве HLA (см. Фиг. 13), в цистеины и/или (ii) мутации аминокислоты в положении 22, фенилаланина в большинстве HLA (см. Фиг. 13) и аминокислоты в положении 71, серина в большинстве HLA (см. Фиг. 13), и/или (iii) мутации аминокислоты в положении 51, триптофана в большинстве HLA (см. Фиг. 13), и аминокислоты в положении 175, глицина в большинстве HLA (см. Фиг. 13), или (iv) мутации аминокислоты в положении 22, фенилаланина в большинстве HLA (см. Фиг. 13) и аминокислоты в положении 71, серина в большинстве HLA (см. Фиг. 13), и мутации аминокислоты в положении 51, триптофана в большинстве HLA (см. Фиг. 13), и аминокислоты в положении 175, глицина в большинстве HLA (см. Фиг. 13) молекулы МНС I (согласно нумерации IGMT за исключением первых 24 аминокислот). Такая стабилизированная молекула МНС может именоваться дисульфид-модифицированной молекулой МНС или дисульфид-модифицированным мутантом МНС. Как ТКР, так и молекула МНС может быть подходящим образом иммобилизована на твердой фазе, такой как чип, предметное стекло, биосенсор или микросфера, в частности как формата высокопроизводительного скрининга.

Во втором аспекте настоящего изобретения предложен полипептид, включающий или состоящий из стабилизированной молекулы МНС или ее фрагмента, связывающегося с пептидом, которая включает по меньшей мере один искусственно введенный ковалентный мостик:

- (i) между двумя аминокислотами в альфа-1-домене МНС I; и/или

- (ii) между одной аминокислотой в альфа-1-домене МНС I и одной аминокислотой в альфа-2-домене МСН I в пределах положений аминокислот 160 – 179; или
- (iii) двумя аминокислотами альфа-1-домена или двумя аминокислотами бета-1-домена МНС II; и/или
- (iv) между одной аминокислотой в альфа-1-домене МНС II и одной аминокислотой в бета-1-домене МСН II.

Выбор двух положений аминокислот, которые модифицируются, например, за счет искусственного введения остатка цистеина вместо встречающейся в природе аминокислоты, для образования ковалентного мостика производится на основании их относительной отдаленности. Если две аминокислоты в молекуле МНС I или МНС II, которые не связаны друг с другом пептидными связями в природе, расположены на таком расстоянии друг от друга, которое подобно длине ковалентной связи, предпочтительно, если они будут заменены на аминокислоту, которая может образовывать ковалентную связь, например, на цистеин. Таким образом, предпочтительно, если две аминокислоты модифицированы так, чтобы расстояние в свернутом белке составляло 3–7,5 Å (определенное между альфа-атомами углерода соответствующих аминокислот). Структуры 3D обширного числа молекул МНС I и МНС II известны, и опытный специалист может использовать стандартные компьютерные программы для определения расстояния между двумя заданными аминокислотами внутри свернутых молекул.

Если две аминокислоты модифицированы в альфа-1-домене молекулы МНС I, то предпочтительно, если одна аминокислота модифицирована в модуле $\beta 1$ и одна в модуле $\alpha 1$ молекулы МНС I. В частности, подходящие области в модуле $\beta 1$ расположены в пределах положений аминокислот 12–32, предпочтительно в пределах положений аминокислот 17–27, более предпочтительно в пределах положений аминокислот 20–24 и наиболее предпочтительно – в положении аминокислоты 22. В частности, подходящие области в модуле $\alpha 1$ расположены в пределах положений аминокислот 61–81, предпочтительно в пределах положений аминокислот 66–76, более предпочтительно в пределах положений аминокислот 69–73 и наиболее предпочтительно – в положении аминокислоты 71. В каждом случае две аминокислоты предпочтительно выбирают в пределах соответственно указанных фрагментов последовательности аминокислот так, чтобы расстояние

составляло 3–7,5 Å в свернутом белке МНС I или МНС II класса (определенное между альфа-атомами углерода соответствующих аминокислот).

Если эти две аминокислоты модифицированы в альфа-1-домене молекулы МНС II, то предпочтительно, если одна аминокислота модифицирована в модуле $\beta 1$ и одна – в модуле $\alpha 1$ молекулы МНС II. В частности, подходящие области в модуле $\beta 1$ расположены в пределах положений аминокислот 10–40, предпочтительно в пределах положений аминокислот 13–35, более предпочтительно в пределах положений аминокислот 22–25 и наиболее предпочтительно – в положении аминокислоты 22. В частности, подходящие области в модуле $\alpha 1$ расположены в пределах положений аминокислот 45–78, предпочтительно в пределах положений аминокислот 50–70, более предпочтительно в пределах положений аминокислот 56–66 и наиболее предпочтительно – в положении аминокислоты 59. В каждом случае две аминокислоты предпочтительно выбирают в пределах соответственно указанных фрагментов последовательности аминокислот так, чтобы расстояние составляло 3–7,5 Å в свернутом белке МНС I или МНС II класса (определенное между альфа-атомами углерода соответствующих аминокислот).

Если две аминокислоты модифицированы в бета-1-домене молекулы МНС II, то предпочтительно, если одна аминокислота модифицирована в модуле $\beta 3$ и одна в $\alpha 3$ молекулы МНС II. В частности, подходящие области в модуле $\beta 3$ расположены в пределах положений аминокислот 15–53, предпочтительно в пределах положений аминокислот 17–41, более предпочтительно в пределах положений аминокислот 21–28 и наиболее предпочтительно – в положении аминокислоты 26. В частности, подходящие области в модуле $\alpha 3$ расположены в пределах положений аминокислот 52–88, предпочтительно в пределах положений аминокислот 66–76, более предпочтительно в пределах положений аминокислот 65–80 и наиболее предпочтительно – в положении аминокислоты 75. В каждом случае две аминокислоты предпочтительно выбирают в пределах соответственно указанных фрагментов последовательности аминокислот так, чтобы расстояние составляло 3–7,5 Å в свернутом белке МНС I или МНС II класса (определенное между альфа-атомами углерода соответствующих аминокислот).

Если одна аминокислота модифицирована в альфа-1-домене молекулы МНС I и одна аминокислота – в альфа-2-домене молекулы МНС I в пределах положений аминокислот 160–179, то предпочтительно, если одна аминокислота в альфа-1-домене модифицирована в модуле $\alpha 1$, предпочтительно в пределах положений аминокислот 50–70, более предпочтительно в пределах положений аминокислот 50–60, более предпочтительно – 50–54 и наиболее предпочтительно – в положении аминокислоты 51. Предпочтительно, если другая аминокислота в альфа-2-домене модифицирована в модуле $\alpha 2$, подходящие области расположены в пределах положений аминокислот 165–178, предпочтительно в пределах положений аминокислот 170–177, более предпочтительно в пределах положений аминокислот 173–176 и наиболее предпочтительно – в положении аминокислоты 175. В каждом случае две аминокислоты предпочтительно выбирают в пределах соответственно указанных фрагментов последовательности аминокислот так, чтобы расстояние составляло 3–7,5 Å в свернутом белке МНС I. Таким образом, в особенно предпочтительном варианте осуществления стабилизированная молекула МНС I включает модифицированную аминокислоту в положении 51 и в положении 175.

Если одна аминокислота модифицирована в альфа-1-домене молекулы МНС II и одна аминокислота – в бета-1-домене молекулы МНС II, то в одном варианте осуществления предпочтительно, если одна аминокислота в альфа-1-домене модифицирована в модуле $\alpha 1$. В одной паре модифицированных аминокислот первая модифицированная аминокислота находится в пределах положений аминокислот 50–70, более предпочтительно – в пределах положений аминокислот 50–60, более предпочтительно 50–54, и наиболее предпочтительным является положение аминокислоты 51. Другая модифицированная аминокислота в бета-1-домене расположена предпочтительно в пределах модуля $\alpha 3$, охватывающего положения аминокислот 70–95, предпочтительно в пределах положений аминокислот 74–94, предпочтительно в пределах положений аминокислот 83–93, более предпочтительно в пределах положений аминокислот 87–92 и наиболее предпочтительно – в положении аминокислоты 89. В другой паре первая модифицированная аминокислота расположена в пределах положений аминокислот 70–90, более предпочтительно в пределах положений аминокислот 70–85, более предпочтительно – 72–79 и наиболее предпочтительно – в положении аминокислоты 76. Другая модифицированная аминокислота в бета-1-домене расположена предпочтительно в пределах модуля $\alpha 3$, охватывающего положения

аминокислот 50–95, предпочтительно в пределах положений аминокислот 50–65, предпочтительно в пределах положений аминокислот 50–60, более предпочтительно в пределах положений аминокислот 50–55 и наиболее предпочтительно – в положении аминокислоты 53. В каждом случае эти две аминокислоты предпочтительно выбирают в пределах соответственно указанных фрагментов последовательности аминокислот так, чтобы расстояние составляло 3–7,5 Å в свернутом белке МНС II.

Кроме того, предпочтительно, если в пределах одной молекулы МНС содержатся две пары модифицированных аминокислот. В частности, предпочтительные комбинации, которые могут быть скомбинированы приведены выше под пунктами (i) и (ii) для МНС I под пунктами (iii) и (iv) для МНС II. Таким образом, предпочтительно, если первая пара модифицированных аминокислот включает одну аминокислоту, которая модифицирована в модуле $\beta 1$, и одну – в модуле $\alpha 1$ молекулы МНС I. В частности, подходящие области в модуле $\beta 1$ расположены в пределах положений аминокислот 12–32, предпочтительно в пределах положений аминокислот 17–27, более предпочтительно в пределах положений аминокислот 20–24 и наиболее предпочтительно – в положении аминокислоты 22. В частности, подходящие области в модуле $\alpha 1$ расположены в пределах положений аминокислот 61–81, предпочтительно в пределах положений аминокислот 66–76, более предпочтительно в пределах положений аминокислот 69–73 и наиболее предпочтительно – в положении аминокислоты 71. Вторая пара модифицированных аминокислот включает одну аминокислоту, которая модифицирована в альфа-1-домене МНС I и одну аминокислоту в альфа-2-домене МНС I в пределах положений аминокислот 160–179. Предпочтительно, если одна аминокислота в альфа-1-домене модифицирована в модуле $\alpha 1$, предпочтительно в пределах положений аминокислот 50–70, более предпочтительно в пределах положений аминокислот 50–60, более предпочтительно в пределах положений аминокислот 50–54 и наиболее предпочтительно – в положении аминокислоты 51. В частности, подходящие области для модификации другой аминокислоты в домене альфа-2 расположены в пределах положений аминокислот 165–178, предпочтительно в пределах положений аминокислот 170–177, более предпочтительно в пределах положений аминокислот 173–176 и наиболее предпочтительно – в положении аминокислоты 175. Таким образом, в особенно

предпочтительном варианте осуществления стабилизированная молекула МНС I включает первую пару модифицированных аминокислот в положениях 22 и 71 и вторую пару модифицированных аминокислот в положении 51 и в положении 175.

Любая из указанных выше модификаций МНС I может быть дополнительно скомбинирована с парой модификаций, в которой первая модифицированная аминокислота расположена в пределах положений аминокислот 80–90, предпочтительно в пределах положений аминокислот 82–86, и более предпочтительно – в положении аминокислоты 84, а вторая аминокислота расположена в пределах положений аминокислот 136–146, предпочтительно в пределах положений аминокислот 137–141, и более предпочтительно – в положении аминокислоты 139.

Неожиданным оказалось то, что модификация аминокислот в описанных выше аминокислотных областях молекул МНС I и МНС II и в соответствующих положениях и, таким образом, введение ковалентных связей между аминокислотами в положениях, которые не соединены ковалентными связями в природе, позволяет получить модифицированные молекулы МНС I и МНС II, которые: (i) правильно свернуты, (ii) связываются с пептидами с высокой аффинностью и (iii) распознаются молекулами ТКР с высокой специфичностью и селективностью.

Предпочтительные модифицированные молекулы МНС I и МНС II по второму аспекту могут быть также использованы во всех других аспектах настоящего изобретения.

Настоящее изобретение также включает фрагменты модифицированных молекул МНС I или МНС II, связывающиеся с пептидом. Как известно из уровня техники, молекулы МНС I и МНС II связываются с пептидами, и, в свою очередь, связываются ТКР, которые взаимодействуют как с молекулами МНС I или МНС II, так и с пептидом. Однако для связывания с пептидом, который «презентируется» ТКР, необходимы только части молекулы МНС I и МНС II. В молекуле МНС I домены альфа-1 и альфа-2 сворачиваются с образованием связывающей бороздки, за счет которой происходит связывание с пептидом, а в молекуле МНС II домены альфа-1 и бета-1 образуют связывающую бороздку, которая связывается с пептидом. Таким

образом, фрагменты МНС I и МНС II, связывающиеся с пептидом, соответственно, включают по меньшей мере домен альфа-1 и альфа-2 или домен альфа-1 и бета-1. Соответственно, в связывающемся домене может отсутствовать трансмембранный домен или, помимо этого, домен альфа-3 в молекуле МНС I или домен альфа-2 и/или домен бета-2 в молекуле МНС II. Фрагменты, в которых отсутствует по меньшей мере трансмембранный домен, являются растворимыми и являются особенно подходящими для использования в фармацевтической композиции, в частности, в вакцине.

В третьем аспекте настоящего изобретения предложен способ обнаружения или получения специфического связывающего аминокислотного мотива для ТКР, включающий осуществление способа в соответствии с первым аспектом изобретения, включающего предварительно выбранный ТКР, и дополнительного этапа определения и сравнения аминокислотных последовательностей тех пептидных лигандов в указанных комплексах пептидного лиганда и молекулы МНС, для которых было выявлено связывание с ТКР, за счет чего идентифицируется специфический связывающий аминокислотный мотив для указанного предварительно выбранного ТКР.

В четвертом аспекте настоящего изобретения предложен способ обнаружения или определения перекрестного взаимодействия у ТКР, включающий осуществление способа в соответствии со вторым аспектом изобретения, и дополнительного этапа определения и сравнения аминокислотных последовательностей тех пептидных лигандов в указанных комплексах пептидного лиганда и молекулы МНС, для которых было выявлено связывание с ТКР, за счет чего идентифицируется перекрестное взаимодействие указанного ТКР.

В пятом аспекте настоящего изобретения предложен способ обнаружения или определения перекрестного взаимодействия ТКР, включающий осуществление способа в соответствии с первым аспектом изобретения, включающего предварительно выбранный ТКР, и дополнительного этапа определения и сравнения аминокислотных последовательностей тех пептидных лигандов в указанных комплексах пептидного лиганда и молекулы МНС, для которых было выявлено связывание с ТКР, за счет чего идентифицируется перекрестное взаимодействие указанного ТКР.

В шестом аспекте изобретения способы в соответствии с настоящим изобретением могут быть использованы для скрининга или прайминга *in vitro* лекарственных препаратов на основе клеток. Стабилизированные комплексы HLA, связанные с микрогранулами, волокнами, наночастицами или другими носителями, могут быть легко нагружены интересующим пептидом, имитируя антигенпрезентирующие клетки, и после этого могут легко применяться в комбинации с костимуляторными молекулами (например, антителами к CD28, 4 1BB) в виде «готовых к применению» искусственных антигенпрезентирующих клеток в целях прайминга и экспансии *in vitro*.

Имеющиеся на данный момент способы крупномасштабного получения библиотек pMHC, высокопроизводительного определения связывающего мотива высокоаффинного ТКР и идентификация и характеристика потенциально перекрестно реагирующих пептидов осложнены проблемами стабильности. Для них требуются мультимеры, на которые должны быстро, без дополнительных действий и в сжатые сроки, нагружаться выбранные пептиды (как описано в работе Luimstra и соавт., см. выше), что также делает непригодными такие технологии, как обмен под воздействием УФ.

Благодаря настоящей технологии авторы изобретения извлекли множество преимуществ по сравнению с молекулой дикого типа или другими существующими технологиями обмена: пустой мономер может быть получен в большом количестве заблаговременно до эксперимента, и получение pMHC не ограничивается никаким другим способом, кроме обеспечения желаемыми пептидами и быстрыми реакциями по загрузке пептидов. Авторы изобретения успешно хранили пустые мономеры в течение не менее года при -80°C и использовали их без обнаружения признаков деградации или ухудшения восприимчивости к пептидам. Авторы также успешно хранили полученные в результате комплексы pMHC в течение не менее двух недель при 4°C и повторно использовали их для измерений аффинности без потери сигнала. В дополнение ко всем этим преимуществам благодаря введению модификации, полученные комплексы pMHC, презентируемые мутантами, являются по существу репрезентативными для комплексов дикого типа в отношении связывания лигандов с ТКР.

В одном аспекте изобретения предложен способ скрининга на комплексы связывающихся с ТКР пептидных лигандов с молекулами МНС для связывания с ТКР.

Способ включает применение стабилизированной подходящим образом молекулы МНС, которая включает по меньшей мере один искусственно введенный ковалентный мостик между аминокислотами домена альфа-1 и аминокислотами домена альфа-2 указанной стабилизированной молекулы МНС в случае молекулы МНС I, и/или по меньшей мере один искусственно введенный ковалентный мостик между двумя аминокислотами домена альфа-1 указанной стабилизированной молекулы МНС в случае молекулы МНС I, или по меньшей мере один искусственно введенный ковалентный мостик между аминокислотами домена альфа-1 и аминокислотами домена бета-1 указанной стабилизированной молекулы МНС в случае МНС II. Главный комплекс гистосовместимости I класс и II класса имеют общую похожую пространственную организацию. Платформа связывания образована двумя доменами, возникшими из отдельной тяжелой α -цепи (НС) в случае МНС I класса и из двух цепей – в случае МНС II класса (α -цепи и β -цепи). Эти два домена разворачиваются, образовав слегка скривленный β -лист в качестве основания и две α -спирали сверху, которые достаточно отдалены друг от друга, чтобы вместить пептидную цепь между ними. Следовательно, подходящая стабилизация для способа согласно настоящему изобретению может быть достигнута для обоих классов МНС.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение охватывает применение дисульфид-стабилизированных, изначально пустых, молекул МНС, которые могут быть нагружены с помощью простого добавления подходящего пептида до их использования. Комплексы рМНС, полученные при использовании этой дисульфид-модифицированной молекулы МНС, являются репрезентативными примерами немодифицированного варианта дикого типа и подходят для скрининга, например, высокопроизводительного определения связывающего мотива высокоаффинного ТКР, а также идентификации и характеристики потенциально перекрестно реагирующих пептидов.

Пустые молекулы МНС существенно не разлагаются на обычно используемых поверхностях, таких как стеклянные чашки, они являются репрезентативными

примерами немодифицированного варианта дикого типа, когда нагружены пептидом, и подходят для скрининга, позволяя быстро получить комплексы рМНС, даже в иммобилизованном состоянии на поверхности. В контексте настоящего изобретения это достигается за счет и обозначается понятием «стабилизированный подходящим образом» или «стабилизированный» комплекс рМНС.

В предыдущих исследованиях введением в молекулу МНС I класса Н-2К^b мыши дисульфидной связи между находящимся напротив друг друга остатков в F-кармане за счет мутации замены тирозина в положении 84 и аланина в положении 139 на цистеины было возможно стабилизировать этот комплекс. Таким образом, в одном варианте осуществления искусственно введенный ковалентный мостик между аминокислотами был введен между α -спиралями, например, за счет мутации тирозина в положении 84 и аланина в положении 139 на цистеины молекулы МНС I. Тогда как в некоторых случаях может быть сложно выделить мономеры без какого-либо пептидного лиганда, это можно было эффективно преодолеть за счет добавления пептида с низкой аффинностью.

Понятие «МНС» является аббревиатурой выражения «главный комплекс гистосовместимости». МНС – это набор рецепторов клеточной поверхности, которые играют незаменимую роль в развитии приобретенного иммунитета к измененным природным или чужеродным белкам у позвоночных, что, в свою очередь, определяет гистосовместимость внутри ткани. Основная функция молекул МНС – связываться с антигенами, образованными из измененных белков или патогенов и представлять их на клеточной поверхности для распознавания подходящими Т-клетками. Человеческий комплекс МНС также называется комплексом HLA (человеческий лейкоцитарный антиген) или HLA. Семейство генов МНС подразделено на три подгруппы: I класс, II класс и III класс. Комплексы пептида и молекул МНС I класса распознаются CD8-положительными Т-клетками, несущими подходящий ТКР, тогда как комплексы пептида и молекул МНС II класса распознаются CD4-положительными хелперными Т-клетками, несущими подходящий ТКР. Поскольку оба вида ответов, зависящие от клеток CD8 и CD4, вносят свой вклад в противоопухолевый эффект сообща и синергически, то идентификация и определение характеристик опухолеассоциированных антигенов и соответствующих ТКР являются важными при разработке видов противораковой

иммунотерапии, таких как вакцины и клеточная терапия. Молекула МНС I состоит из альфа-цепи, также называемой тяжелой цепью МНС I, и бета-цепи, которая представляет собой молекулу бета-2-микроглобулина. Альфа-цепь и тяжелая цепь в контексте настоящего изобретения взаимозаменяемы, и включают три альфа-домена, т. е. домен альфа-1, домен альфа-2 и домен альфа-3. Домен альфа-1 и домен альфа-2 в основном участвуют в формировании пептидного кармана при образовании комплекса пептидного лиганда и молекулы МНС (pМНС). Домен альфа-1 молекулы МНС I охватывает положения аминокислот 1–90 и в качестве вторичной структуры включает β -лист, куда входят положения аминокислот 1–49 (именуемый в настоящем контексте модуль « $\beta 1$ »), за которым следует структура в виде α -спирали, охватывающая положения аминокислот 50–84 (именуемая в настоящем контексте модуль « $\alpha 1$ »). Домен альфа-2 молекулы МНС I охватывает положения аминокислот 91–182 и в качестве вторичной структуры включает β -лист, куда входят положения аминокислот 91–135 (именуемый в настоящем контексте модуль « $\beta 2$ »), за которым следует структура в виде α -спирали, охватывающая положения аминокислот 138–179 (именуемая в настоящем контексте модуль « $\alpha 2$ »). Домен бета-1 молекулы МНС II находится на отдельном полипептиде и внутри молекулы МНС II выполняет структурообразующую роль домена альфа-2 в МНС I. Он охватывает положения аминокислот 1–95 и в качестве вторичной структуры включает β -лист, куда входят положения аминокислот 1–49 (именуемый в настоящем контексте модуль « $\beta 3$ »), за которым следует структура в виде α -спирали, охватывающая положения аминокислот 50–95 (именуемая в настоящем контексте модуль « $\alpha 3$ »). В данном контексте и во всех других случаях, когда дается ссылка на положение аминокислот в молекуле МНС I или МНС II положения указаны согласно нумерации IGMT за исключением первого N-терминального сигнального пептида, длина которого обычно варьируется между 20–29 аминокислотами. Стабилизированные молекулы МНС II по настоящему изобретению могут включать домен альфа-1 и бета-1 на двух отдельных полипептидах, или они могут быть связаны друг с другом в один полипептид с образованием одноцепочечной молекулы МНС II, например, С-конец домена альфа-1 молекулы одной МНС II связан с N-концом домена бета-1 молекулы другой МНС II напрямую или через пептидный линкер.

HLA – это молекулы, которые у разных людей отличаются по аминокислотной последовательности. Тем не менее, типы HLA могут быть соотнесены с установленной международной номенклатурой, номенклатурой IMGT, для HLA. Определение категории, например, HLA-A, основано на соответствии заданной молекулы HLA официальным контрольным последовательностям каждого вида HLA, которые были получены за счет выравнивания последовательностей. Таким образом, заданная последовательность HLA с наиболее высоким соответствием последовательности HLA-A согласно SEQ ID NO: 6 будет отнесена к категории HLA-A. Официальные контрольные последовательности HLA, а также информация по системе отнесения к категориям доступны по адресу: www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/nomenclature/alignments.html. На веб-странице представлена следующая информация о том, как присваивать определенную категорию какой-либо заданной последовательности HLA:

«В полученных файлах выравнивания использована следующая номенклатура и система нумерации. Данные правила основаны на рекомендациях, опубликованных в Базе мутаций генов человека «Human Gene Mutation Database». Они были разработаны рабочей группой по номенклатуре, рассматривающей возможности наименования и хранения последовательностей аллельных вариантов человека. С данными рекомендациями можно ознакомиться в работе Antonarakis SE и Nomenclature Working Group Recommendations for a Nomenclature System for Human Gene Mutations Human Mutation (1998) 11 1-3.

- *Только аллели, официально признанные Комитетом по номенклатуре факторов HLA-системы ВОЗ, включены в выравнивание последовательностей.*
- *Согласно рекомендациям для всех генных мутаций человека для всех выравниваний следует использовать стандартную контрольную последовательность. Полный перечень контрольных последовательностей для каждого аллеля представлен далее.*
- *Контрольная последовательность будет всегда ассоциироваться с одним и тем же (исходным) инвентарным номером, если для этой последовательности не выведена ошибка.*
- *Все аллели выровнены с контрольными последовательностями.*
- *Название последовательности дано согласно опубликованным правилам наименования SGE Marsh, et al. (2010) Tissue Antigens 2010 75:291-455.*

Для белков МНС I класса по состоянию на 12 июля 2019 г. на веб-странице были представлены следующие контрольные белковые последовательности HLA с указанием инвентарного номера, который не будет меняться для каждого вида HLA в течение времени:

Белки МНС I класса

HLA-A (SEQ ID NO: 6) (инвент. № HLA00001)

MAVMAPRTL L L L L L SGALALTQTWAGSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVG YVDDTQF
VRFDSDAASQKMEPRAPWIEQEGPEYWDQETRNMKAHSQTDRANLGLRGYYNQ
S EDGSHTIQIMYGCDVGP DGRFLRGYRQDAYDGKDYIALNEDLRSWTAADMAAQITKR
KWEAVHAAEQRRVYLEGRCVDGLRRYLENGKETLQRTDPPKTHMTHHPISDHEATLR
CWALGFYP AEITLTWQRDGEDQTQDTEL VETRPAGDGT FQKWA AVVVP SGEEQRYT
CHVQHEGLPKPLTLRWELSSQPTIPVIGIAGLVLLGAVITGAVVA VMWRRKSSDRKG
GSYTQAASSDSAQGS DVSLTACKV

HLA-B (SEQ ID NO: 7) (инвент. № HLA00132)

MLVMAPRTV L L L L L SAALALTETWAGSHSMRYFYTSVSRPGRGEPRFISVG YVDDTQFV
RFDSDAASPREPRAPWIEQEGPEYWD RNTQIYKAQAQTDRESLRNLRGYYNQSEA
GSHTLQSMYGCDVGP DGRLLRGHDQYAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRK
WEAAREAEQRRAYLEGECEVWLRRYLENGKDKLERADPPKTHVTHHPISDHEATLR
C WALGFYP AEITLTWQRDGEDQTQDTEL VETRPAGDRTFQKWA AVVVP SGEEQRYTC
HVQHEGLPKPLTLRWEPSSQSTVPIVGIVAGLAVLAVVIGAVVA VMCRRKSSGGKG
GSYSQAACSDSAQGS DVSLTA

HLA-C (SEQ ID NO: 8) (инвент. № HLA00401)

MRVMAPRTL L L L L L SGALALTETWACSHSMKYFFTSVSRPGRGEPRFISVG YVDDTQFV
RFDSDAASPRGEPRAPWVEQEGPEYWDRETQKYKRQAQTD RVSLRNLRGYYNQSE
AGSHTLQWMCGCDLGP DGRLLRGYDQYAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQR
KWEAAREAEQRRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRAEHPKTHVTHHPVSDHEATL
RCWALGFYP AEITLTWQWDGEDQTQDTEL VETRPAGDGT FQKWA AVVMVP SGEEQR
YTCHVQHEGLPEPLTLRWEPSSQPTIPVIGIVAGLAVLAVLAVLGAVVAVVMCRRKSSG
GKGGSCSQAASSNSAQGS DESLIACKA

HLA-E (SEQ ID NO: 9) (инвент. № HLA00934)

MVDGTL L L L L L SEALALTQTWAGSHSLKYFHTSVSRPGRGEPRFISVG YVDDTQFVRFD
NDAASPRMVPRAPWMEQEGSEYWDRETRSARDTAQIFRVNLR TLRGYYNQSEAGSH
TLQWMHGCELGPDRRFLRGYEQFAYDGKDYLT LNEDLRSWTAVDTAAQISEQKSND
ASEAEHQRAYLEDTCVEWLHKYLEKGKETLLHLEPPKTHVTHHPISDHEATLR C WALG
FYP AEITLTWQQDGEGHTQDTEL VETRPAGDGT FQKWA AVVVP SGEEQRYTCHVQH
EGLPEPVTLRWKPASQPTIPVIGIAGLVLLGSVVS GAVVA AVIWRKKSSGGKGGSYSK
AEWSDSAQGSESHSL

HLA-F (SEQ ID NO: 10) (инвент. № HLA01096)

MAPRSLLLLLSGALALTDTWAGSHSLRYFSTAVSRPGRGEPRIYAVEYVDDTQFLRFD
SDAAIPRMEPREPWVEQEGPQYWEWTTGYAKANAQTDRVALRNLLRRYNQSEAGSH
TLQGMNGCDMGPDGRLLRGYHQHAYDGKDYISLNEDLRSWTAADTVAQITQRFYEAE
EYAEFRTYLEGECLELLRRYLENGKETLQRADPPKAHVAHHPISDHEATLRCWALGF
YPAEITLTWQRDGEETQDTELVEVTRPAGDGTGFKWAAVVPSGEEQRYTCHVQHE
GLPQPLILRWEQSPQPTIIVGIVAGLVVLGAVVTGAVVAAMWRKKSSDRNRGSYSQ
AAV

HLA-G (SEQ ID NO: 11) (инвент. № HLA00939)

MVVMAPRTLFLLLSGALTLTETWAGSHSMRYFSAAVSRPGRGEPRIAMGYVDDTQF
VRFDSDSACPRMEPRAPWVEQEGPEYWEETRNTKAHAQTDRMNLQTLRGYYNQS
EASHTLQWMIGCDLGSDGRLLRGYEQYAYDGKDYALNEDLRSWTAADTAAQISKR
KCEAANVAEQRRAYLEGTCVEWLHRYLENGKEMQLRADPPKTHVTHHPVFDYEATLR
CWALGFYPAEIILTQWRDGEDQTQDVELVEVTRPAGDGTGFKWAAVVPSGEEQRYTC
HVQHEGLPEPLMLRWKQSSLPITIPMGIVAGLVVLAAVVTGAAVA AVLWRKKSSD

HLA-H (SEQ ID NO: 12) (инвент. № HLA02546)

MVLMAPRTLFLLLSGALALTQTWARSHSMRYFYTTMSRPGRGEPRIISVG YVDDTQF
VRFDSDAASQRMEPRAPWMEREGPEYWD RNTQICKAQAQTERENLRALRYYNQSE
GGSHTMQVMYGCDVGP DGRFLRGYEQHAYDSKDYIALNEDLRSWTAADMAAQITKR
KWEAARQAEQLRAYLEGFVEWLRRYLENGKETLQRADPPKTHMTHHPISDHEATLR
CWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTHTRSSWRPGLQGMPEPSRSGRLWWCLLERSRDT
PAMCSMRVCQSPSP*DGSHLPSPSPSWASLLAWFYL*LWSLELWSLL*CGGRRAQIE
KEGATLRLQAATVPRALMCLSRRESVX

HLA-J (SEQ ID NO: 13) (инвент. № HLA02626)

MGSWRPEPSSCCSRGPWPWRPGRAPTP*GISAPFP GRAAGSPASLPWATWTTRS
SCGSTVTP*V*G*RRGRGGWSRRGRSIGTYRHWAPRPRHRLTE*TCGPCSATTTRAR
RGITSSRECLAATWGPTGVSSAGMSSMPTTARITSP*TRTCAPGPPRIPRLRLPSASM
RRPMWLKSGEPTWRAPAWSGSADTWRTGRRRCSARTPPKTHVTHPPL*T*GITRSW
VLGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDMELVEVTRPTGDGTGFKWAVVPSGEEQRYTCH
VQHKGLPKPLILRWEPSQPTIIVGIIAGLVLLGAVVTGAVVTAVMWRKKSSDRKGG
YSQAASSQSAQGS DVSLTACKV*

HLA-K (SEQ ID NO: 14) (инвент. № HLA02654)

MGSWRPEPSSCCSWGPWP*PRPGRVPTP*GISAPPCPGRVAGSPGTSQWATWTTR
SSCGSTATRRLRGCSRSRRGWSRRDRSIGTGAHGTSGPRTD*QE*TCPCRAATTTRA
RPGLTPSR*CMAATWGWKGASSAGMNSTPTMARIT*PGTRTCAPGPRRTWRLRSPS
ASGRQKNLQSRSGPTWRARAWRGSQTPGEREGDAAAHGPLPQTHMIHHSVSDYKA
TLRCWALGFYPVEITLAWQQDGEDQTRDMELLETRPAGDGTGFKWAAVVPSGEEQ
RYPCHVQHEGLPKPLTLRWEQSSQPTIIVGIVAGLVLLGAVVTGAVVS AVMCRRKNS
DRVSYSEAASSDHAQGS DVSLTACKV*

HLA-L (SEQ ID NO: 15) (инвент. № HLA02655)

MGVMAPRTLFLLLLLGALALTETWAGSHSLRYFSTAVSQPGRGEPRIAVGYVDDTEFV
RFDSDSVSPRMERRAPWVEQEGLEYWDQETRNAKGHAQIYRVNLR TLLRYYNQSEA
GSHTIQRKHGCDVGPTGASSAGMNSSPTMARITSP*TRTCTPGPPRTQRLRSPSTSG
KRTNTQSRSGPT*GQVHGVAPQTPGEREGDAAARGSPKGTCDPAPHL*P*GHPEVLG

PGPLPCGDHTDLAAGWGGPDPGHGACGDQACRGRNLPEVGGCSGAFRRGAEIHVP
CAA*GAARAPHPEMGAVFSAHHPHRGHRCWPVSPWSCGHWSCGCCCDVEEEKLR*
NKEELCSGCLQQLCSVL*CIS*YL*SLX

Ген HLA-A расположен на коротком плече хромосомы 6 и кодирует более крупную, α-цепь, являющуюся компонентом HLA-A. Вариации HLA-A α-цепи являются ключевым фактором для функции HLA. Такая вариабельность способствует генетическому разнообразию в популяции. Поскольку каждый вид HLA обладает различной аффинностью к пептидам определенных структур, то чем больше разнообразие видов HLA, тем больше антигенов, которые могут «презентироваться» на клеточной поверхности. Каждый индивид может экспрессировать вплоть до двух аллелей HLA-A, по одному от каждого из его родителей. Некоторые индивиды наследуют тот же самый аллель HLA-A от обоих родителей, снижая их индивидуальное разнообразие HLA. Однако большинство индивидов получают две разные копии HLA-A. Все группы HLA следуют одной и той же схеме. Другими словами, каждое отдельное лицо может экспрессировать лишь один или два из 2432 известных аллелей HLA-A, кодирующих на данный момент 1740 активных белков. HLA-A*02 обозначается специфический аллель HLA, где буква A обозначает, к какому гену HLA относится аллель, а префикс «*02» указывает на серотип A2. В зависящих от МНС I класса иммунных реакциях пептиды не только должны быть в состоянии связываться с конкретными молекулами МНС I класса, экспрессируемыми опухолевыми клетками, но они также должны затем распознаваться Т-клетками, несущими специфические ТКР.

На втором этапе предпочтительного способа в соответствии с изобретением производится контактирование стабилизированной подходящим образом молекулы МНС с множеством пептидных лигандов, чтобы получить комплексы пептидного лиганда и молекулы (рМНС). Использование комплексов рМНС в виде растворимых аналитов вместо иммобилизации является предпочтительным для быстрого и экономически выгодного высокопроизводительного скрининга, поскольку существует широкий спектр регенирируемых биосенсоров, способных к обратной иммобилизации биспецифических ТКР-структур.

«Контактирование» в контексте настоящего изобретения обозначает, что пептид(ы) вводят в контакт с пустыми и/или нагруженными пептидом с низкой аффинностью молекулами МНС таким образом, что существенная часть пептидов образует

комплексы (производится «загрузка») с указанными пустыми и/или нагруженными пептидом с низкой аффинностью молекулами МНС. В качестве одного предпочтительного примера комплексы МНС нагружали посредством добавления и смешивания желаемых пептидов по меньшей мере в молярном соотношении 100 к 1 по отношению к раствору мономера в подходящем буфере, и инкубации при комнатной температуре в течение не менее чем 5 минут.

Бороздка между двумя спиралями вмещает пептиды на основании (i) образования набора консервативных водородных связей между боковыми цепями молекулы МНС и остовом пептида и (ii) размещения боковых цепей пептидов в определенных карманах (якорные остатки P2 или P5/6 и PΩ в молекулах МНС I класса и P1, P4, P6 и P9 в молекулах МНС II класса). Вид взаимодействия отдельных боковых цепей пептидов с молекулой МНС зависит от геометрического строения, распределения заряда и гидрофобности связывающей бороздки. В молекуле МНС I класса связывающая бороздка закрыта с обоих концов консервативными остатками тирозина, что приводит к ограничению связанных пептидов по размеру обычно до 8–10 остатков, с С-концом, закрепленным в F-кармане. Напротив, белки МНС II класса в их открытой связывающей бороздке обычно вмещают пептиды из 13–25 остатков в длину, обычно с выступающим N-концом пептида из кармана P1. Сообщалось, что такие взаимодействия в области F-кармана молекул МНС I класса и области P1 (включая сайт P2) молекул МНС II класса, по-видимому оказывают решающее влияние на презентацию устойчивых комплексов рМНС и на иммунодоминантность определенных пептидных эпитопов. Интересно, что эти карманы расположены на противоположных концах связывающей бороздки соответствующих структур МНС I класса и МНС II класса.

Множество пептидных лигандов может включать по меньшей мере примерно 1500 различных связывающихся с молекулами МНС пептидов, предпочтительно по меньшей мере примерно 5000 различных связывающихся с молекулами МНС пептидов, более предпочтительно по меньшей мере примерно 15 000 различных связывающихся с молекулами МНС пептидов, и наиболее предпочтительно препарат на основе иммунопептидом, в который входит по меньшей мере примерно 150 000 связывающихся с молекулами МНС пептидами. Указанные пептиды включают связывающий мотив из 8–10 остатков в длину в случае белков МНС I класса и из 13–25 остатков в длину в случае белков МНС II класса, и их длина может

составлять между 8 и 100, предпочтительно между 8 и 30, более предпочтительно между 8 и 16 остатками. Наиболее предпочтительными являются пептиды, которые состоят лишь из связывающего мотива.

Пептиды-лиганды, используемые в контексте настоящего изобретения, могут быть получены из полипептидов, связанных с раком, инфекцией (бактериальной или вирусной) и даже связанных с иммунным (например, аутоиммунным) заболеванием. В данное понятие также входят пептиды-лиганды с подходящей мутацией или с встречающейся в природе мутацией, т. е. отличающиеся от своей лежащей в основе последовательности, имеющейся у соответствующего полипептида.

Предпочтительным является способ в соответствии с настоящим изобретением, в котором указанное контактирование включает загрузку указанных связывающихся с МНС пептидов на молекулу МНС при температуре между 4° С и 37° С, предпочтительно при комнатной температуре (15°–25° С, предпочтительно при 20° С).

Неожиданным образом было обнаружено, что нагруженные молекулы HLA с пептидом (pMHC или комплекс pMHC) очень устойчивы в течение более чем примерно 1 дня, и предпочтительно в течение более чем 1 недели (например более чем 2 недель) при 4° С. Это делает возможным эффективно и удобно использовать их в гораздо большем спектре видов применения, чем в известных способах, описанных выше.

В контексте настоящего изобретения было также обнаружено, что в некоторой степени противоречит цитируемым выше литературным источникам, что настоящий способ явно превосходит популярный способ УФ-обмена, в котором используется молекула pMHC дикого типа, позволяя осуществлять его (в частности, в высокопроизводительном формате) на поверхности, такой как чип или предметное стекло. Тогда как опосредованный УФ-излучением обмен пептидными лигандами может привести к образованию большого количества различных комплексов pMHC, эффективность обмена варьируется в зависимости от пептида и его аффинности связывания с соответствующим аллелем МНС I класса, приводя в результате к различным концентрациям pMHC в образцах. Данная

неопределенность представляет собой проблему для измерения аффинности с комплексами рМНС, используемыми в качестве растворимых аналитов, поскольку необходимо точно знать концентрацию, чтобы правильно определить аффинность. Так как дисульфид-стабилизированный мутант МНС обладает стабильностью без пептида, то это ограничение отпадает. Если пептиды добавлены в достаточно высокой концентрации, чтобы привести к насыщению пустые комплексы МНС, то действительная концентрация рМНС известна, что существенно повышает точность измерений и позволяет избежать ложно-отрицательных результатов.

На следующем этапе способа настоящего изобретения указанные молекулярные комплексы рМНС подвергают скринингу на связывание с ТКР. Связывание и кинетические характеристики данного взаимодействия являются параметрами для опосредованной Т-клетками иммунной защиты, при этом сильные взаимодействия ТCR–рМНС, демонстрирующие повышенные уровни полупериода взаимодействия, вызывают, тем самым, более сильную активацию и восприимчивость Т-клеток, чем в случае более слабых взаимодействий. Силу взаимодействия между ТКР и лигандом рМНС обычно описывают и измеряют в виде константы диссоциации K_d , константу равновесия, которая представляет собой соотношение константы скорости связывания k_{on} и константы скорости диссоциации k_{off} для специфического взаимодействия. Константа диссоциации K_d обратно коррелирует с силой связывания специфического взаимодействия, поскольку чем меньше значение K_d , тем сильнее сила связывания.

Скрининг может включать любой подходящий и известный метод измерения и/или обнаружения связывания рМНС/ТКР, например, измерение аффинности/авидности комплексов ТКР–рМНС. Одним примером является скрининг библиотеки комплексов пептида и молекулы МНС на связывание с ТКР с помощью биослойной интерферометрии (BLI), особым видом отражательной интерферометрии (RI), как раскрыто в настоящем описании, при котором было обнаружено, что взаимодействия связывания для указанного ТКР были более сильными, чем порог чувствительности, подходящий для метода, при котором K_d $1,0 \times 10^{-5}$, диапазон измеренных значений K_d составлял от $3,7 \times 10^{-9}$ до $7,2 \times 10^{-6}$, либо взаимодействия связывания обнаружены не были, если они были слабее, чем порог чувствительности.

Другие методы включают другие формы RI, такие как поверхностный плазмонный резонанс (SPR), или отражательную интерферометрическую спектроскопию (RIfS), или одноцветную рефлектometriю (SCORE, Biametrics, Тюбинген, Германия), или анализы, основанные на маркерах, например, анализ методом проточной цитометрии NTA-меров (TCMetrix, Эпаланж, Швейцария), или pMHC или ТКР с тетрамерами, или другие формы считывания с помощью флуоресценции, такие как белковые микроматрицы. Разумеется, в идеальном случае эти методы могут быть осуществлены в/могут быть легко адаптированы к высокопроизводительным форматам.

В контексте настоящего изобретения понятие «примерно» подразумевает включение +/- 10% данного значения, если не указано иное.

В настоящем изобретении в качестве примера представлено использование дисульфид-стабилизированных пустых молекул HLA-A*02:01, которые могут быть нагружены за счет простого добавления пептида до использования. Комплексы pMHC, полученные при использовании этой модифицированной молекулы MHC, являются репрезентативными для немодифицированного варианта дикого типа и, таким образом, демонстрируют свою пригодность для высокопроизводительного определения связывающего мотива для высокоаффинного ТКР, а также идентификации и характеристики потенциально перекрестно реагирующих пептидов.

Предпочтительным является способ в соответствии с настоящим изобретением, в котором указанная молекула MHC является HLA или мультимером HLA, MHC I или MHC II, выбранным из группы, состоящей из димера, тримера и тетрамера. Способы с использованием в скрининге одновременно более чем одной молекулы MHC известны из уровня техники, например, из работы Altman и соавт. (в: "Phenotypic Analysis of Antigen-Specific T Lymphocytes.", Science. 4 Oct 1996: Vol. 274, Issue 5284, pp. 94-969. В равной степени, могут быть использованы димеры или тримеры.

Используемые молекулы MHC включают по меньшей мере один ковалентный мостик, искусственно введенный между аминокислотами. Данный мостик выбран из дисульфидного мостика, введенного с помощью рекомбинантных технологий,

введения не встречающихся в природе аминокислот, предназначенных для поперечной сшивки, введения аминокислот для фотосшивки и поперечных сшивок, введенных химическим путем. Введение поперечных сшивок с использованием остатков цистеина описано в настоящем контексте, примерами димерных реагентов для поперечной сшивки являются DPDPB и HBVS, а тримерного компонента для поперечной сшивки – TMEA.

Предпочтительным является способ в соответствии с настоящим изобретением, в котором указанный по меньшей мере один искусственно введенный ковалентный мостик между аминокислотами введен между α -спиралями, например, за счет i) мутации аминокислоты в положении 84 молекулы MHC I, тирозина в большинстве видов HLA (см. Фиг. 13) и аминокислоты в положении 139, аланина в большинстве видов HLA (см. Фиг. 13) в цистеины и/или (ii) мутации аминокислоты в положении 22 молекулы MHC I, фенилаланина в большинстве видов HLA (см. Фиг. 13) и аминокислоты в положении 71 молекулы MHC I, серина в большинстве видов HLA (см. Фиг. 13) и/или (iii) мутации аминокислоты в положении 51 молекулы MHC I, триптофана в большинстве видов HLA (см. Фиг. 13), и аминокислоты в положении 175 молекулы MHC I, глицина в большинстве видов HLA (см. Фиг. 13), или (iv) мутации аминокислоты в положении 22 молекулы MHC I, фенилаланина в большинстве видов HLA (см. Фиг. 13) и аминокислоты в положении 71 молекулы MHC I, серина в большинстве видов HLA (см. Фиг. 13) и аминокислоты в положении 51 молекулы MHC I, триптофана в большинстве видов HLA (см. Фиг. 13), и аминокислоты в положении 175 молекулы MHC I, глицина в большинстве видов HLA (см. Фиг. 13) молекулы MHC I (согласно нумерации IGMT за исключением первых 24 аминокислот). Моделирование молекулярной динамики домена α_1 и α_2 или молекулы MHC-I целиком позволяет предположить существование одной очевидной разницы между пустыми и связанными с пептидом молекулами MHC-I: в отсутствие пептида спиральные отделы, которые примыкают к области F-кармана (остатки 74–85 и 138–149 в спиралах α_1 и α_2 , соответственно) существенно более подвижны. Возможно, что связанные пептиды ограничивают подвижность этой области, и что подобное полезное и стабилизирующее конформационное ограничение могло бы быть достигнуто за счет связывания различных элементов структуры пептид-связывающего кармана ковалентной связью, предпочтительно, дисульфидной связью.

Для определения аминокислот в положениях, соответствующих упомянутым выше остаткам 22, 51, 71, 74–85, 138–149 и 175 в каждом из данных аллелей HLA, соответствующую последовательность выравнивали с указанными выше контрольными антителами. На Фигуре 13 представлен пример выравнивания нескольких последовательностей с официальными контрольными белковыми последовательностями HLA (MHC I класса) и мышинового белка MHC I H2Kb; выделенные положения аминокислот 22, 51, 71, 84, 85, 139, 140 и 175 (жирный шрифт) и другие области, подходящие для введения стабилизирующих мутаций (серый цвет). Фигура 13 позволит опытному специалисту идентифицировать аминокислоты, соответствующие упомянутым выше остаткам в положениях 22, 51, 71, 74–85, 138–149 и 175, в каждом из заданных аллелей HLA.

В одном предпочтительном варианте осуществления молекула MHC I, используемая в настоящем изобретении, является HLA-белком MHC I класса, предпочтительно HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, HLA-H, HLA-J, HLA-K, HLA-L. Согласно контрольным последовательностям номенклатуры IMGT эти предпочтительные белки HLA могут иметь мутацию в своем домене α_1 и домене α_2 , соответственно. Предпочтительно, если эти белки HLA имеют мутацию одной или более, предпочтительно одной аминокислоты в пределах положения 22; одной или более, предпочтительно одной аминокислоты в пределах положения 51, одной или более, предпочтительно одной аминокислоты в пределах положения 71, одной или более, предпочтительно одной аминокислоты в пределах положений 74–85, одной или более, предпочтительно одной аминокислоты в пределах положений 138–149, и одной или более, предпочтительно одной аминокислоты в пределах положения 175. Еще более предпочтительно, если одна аминокислота имеет мутацию в положении 84 или 85, и одна аминокислота имеет мутацию в положении 139 или 140. Еще более предпочтительно, если одна аминокислота имеет мутацию в положении 22, и одна аминокислота имеет мутацию в положении 71. Еще более предпочтительно, если одна аминокислота имеет мутацию в положении 22, и одна аминокислота имеет мутацию в положении 71, и одна аминокислота имеет мутацию в положении 51, и одна аминокислота имеет мутацию в положении 175. Предпочтительными мутациями аминокислот являются замены одной аминокислоты в положениях 74–85 и одной аминокислоты в положениях 138–149 на цистеин. Еще более предпочтительными мутациями аминокислот являются замены одной аминокислоты в положениях 22 на цистеин. Еще более

предпочтительными мутациями аминокислот являются замены одной аминокислоты в положениях 51 на цистеин. Еще более предпочтительными мутациями аминокислот являются замены одной аминокислоты в положениях 71 на цистеин. Еще более предпочтительными мутациями аминокислот являются замены одной аминокислоты в положениях 175 на цистеин.

В другом предпочтительном варианте осуществления белок HLA-A выбран из группы, состоящей из HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3 и HLA-A11. Согласно контрольным последовательностям номенклатуры IMGT эти предпочтительные белки HLA-A могут иметь мутацию в своем домене α_1 и домене α_2 , соответственно. Предпочтительно, если эти белки HLA могут иметь мутацию в положениях аминокислот 22, 51, 74–85, 138–149 и положении аминокислоты 175. Еще более предпочтительно, если белок HLA-A является белком HLA-A*02. Предпочтительными аллелями HLA-A являются HLA-A*02:01; HLA-A*01:01 или HLA-A*03:01.

В другом предпочтительном варианте осуществления белок HLA-B выбран из группы, состоящей из HLA-B*07, HLA-B*08, HLA-B*15, HLA-B*35 или HLA-B*44. Согласно контрольным последовательностям номенклатуры IMGT эти предпочтительные белки HLA-B могут иметь мутацию в своем домене α_1 и домене α_2 , соответственно. Предпочтительно, если эти белки HLB могут иметь мутацию в положениях аминокислот 74–85 и положениях аминокислот 138–149. Предпочтительными аллелями HLA-B являются HLA-B*07:02; HLA-B*08:01, HLA-B*15:01, HLA-B*35:01 или HLA-B*44:05.

В контексте настоящего изобретения понятие «ТКР» включает любую белковоподобную молекулу/структуру, которая включает образованный из ТКР или ТКР-подобный связывающий домен, причем эта молекула/структура подходит для анализа/выявления связывания рМНС с ТКР в соответствии с изобретением, как это описано в настоящем контексте. В случае α - и/или β -цепи ТКР сюда может входить молекула, в которой обе цепи сохраняют способность образовывать Т-клеточный рецептор (как с немодифицированной α - и/или β -цепью, так и со слитым белком или модифицированной α - и/или β -цепью), который выполняет свою биологическую функцию, в частности – связывание со (специфическим) рМНС,

и/или трансдукцию функционального сигнала при активации пептидом. Предпочтительным является способ в соответствии с настоящим изобретением, в котором указанный ТКР выбирают из природного ТКР, молекулы растворимого ТКР, одноцепочечного ТКР и ТКР-подобных молекул, включающих образованный из ТКР или ТКР-подобный связывающий домен (например, образованный из антитела), такой как биспецифический (bs) ТКР, например, такой как описанные в данном контексте.

Способы в соответствии с настоящим изобретением в предпочтительных вариантах осуществления позволяют осуществлять параллельное обнаружение, анализ и/или скрининг namного большего числа пептидных лигандов и/или рМНС, по сравнению с обычными методиками, в том числе методами, связанными с обменом под воздействием УФ-излучения. Совокупность пептидов, презентруемая поверхности клетки молекулами человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) I и II класса, именуется иммунпептидомом. Уже в мае 2017 года с высокой достоверностью сообщалось о 119 073 пептидах HLA I класса и 73 465 пептидах HLA II класса (Shao W, Pedrioli PGA, Wolski W, et al. The SystemHC Atlas project. *Nucleic Acids Research*. 2018;46 (Database issue):D1237-D1247), и поэтому следует ожидать, что иммунпептидом человека по количеству превышает 150 000 пептидов, связывающихся с молекулами МНС для каждого из классов I и II. Имеющиеся на сегодняшний день способы позволяют анализировать примерно 700 пептидов в день, так что существует потребность в «настоящих» высокопроизводительных способах, т. е. множество анализируемых пептидных лигандов, включающее по меньшей мере примерно 1500 различных связывающихся с молекулами МНС пептидов, предпочтительно по меньшей мере примерно 5000 различных связывающихся с молекулами МНС пептидов, более предпочтительно по меньшей мере примерно 15 000 различных связывающихся с молекулами МНС пептидов, и, наиболее предпочтительно, в существенной степени полный препарат на основе иммунпептидома, в который входят по меньшей мере 150 000 связывающихся с молекулами МНС пептидов.

Способы по изобретению позволяют производить скрининг по всему иммунпептидому в течение такого короткого периода времени, как день.

С точки зрения количества связываний рМНС с ТКР, которые должны быть выявлены/проанализированы, предпочтительным является способ в соответствии с настоящим изобретением, в котором указанный способ осуществляется в формате высокопроизводительного скрининга (HTS). В формате HTS одновременному анализу на наличие связывания рМНС с ТКР в заданных условиях могут подвергаться вплоть до сотен тысяч экспериментальных образцов. Образцы обычно и предпочтительно подготавливаются лабораторной робототехникой, за счет чего автоматизируется подготовка образцов, их отбор и анализ данных. Таким образом в рамках HTS просто и достоверно генерируются и используются обширные массивы данных с целью получить ответ на сложные биологические вопросы, например, относительно кинетики связывания рМНС и ТКР и биологической функции его продукта, как это описано в данном контексте.

Для HTS классически требуются подготовка образцов в матричном формате. При необходимости упорядоченные образцы могут быть выращены как на микротитровальных планшетах в жидкости, так и на твердом агаре. Формат планшетов может варьироваться от 96, 192, 384, 768, 1536 до 6144 лунок. Все эти форматы являются кратными 96, отражая первоначальный формат 96-луночного микротитровального планшета, разбитого на 8 x 12 лунок с промежутками 9 мм (см. также, например, Bean GJ, Jaeger PA, Bahr S, Ideker T. «Development of Ultra-High-Density Screening Tools for Microbial “Omics.”» PLoS ONE. 2014 Jan 21;9(1):e85177).

Для применения, связанного с анализом/выявлением кинетики связывания рМНС и ТКР, как это описано в настоящем контексте, может использоваться твердая поверхность, такая как чип, биосенсор, предметное стекло или микрогранулы, на которой подходящим образом могут быть иммобилизованы, например, нанесены, анализируемые реагенты (например, как ТКР, так и молекула МНС). Для иммобилизации может быть использована любая методика, например, взаимодействие биотина и стрептавидина. Примерами вариантов осуществления, описанных в данном контексте, являются анализы связывания, включающие связывание по меньшей мере одного растворимого ТКР с по меньшей мере одним иммобилизованным рМНС, связывание по меньшей мере одного иммобилизованного ТКР с по меньшей мере одним растворимым рМНС.

Предпочтительным является способ в соответствии с настоящим изобретением, причем указанный ТКР и/или молекула МНС не является/не являются меченым(и) или мечен(ы) обнаруживаемым маркером. Соответствующие маркеры известны из уровня техники и включают прямое или не прямое мечение радиоактивными, флуоресцентными или химическими группами (например, красителями). Также могут использоваться ферментные маркеры или антигенные маркеры (для обнаружения антителами), а также маркеры молекулярной массы. Другим вариантом являются кодирующие маркеры (например, специфические нуклеиновые кислоты). В случае отсутствия мечения, чтобы идентифицировать связывание может быть использовано выявление связывания на основе таких изменений физического состояния при образовании комплекса/связывании, как изменение массы, заряда или изменение оптических свойств, например, оптической толщины биослоя при связывании с аналитом, и, таким образом, интерференционной картины или коэффициента отражения.

Способы выявления связывания, в частности, «специфического» связывания рМНС с ТКР, известны из уровня техники. В настоящем изобретении предпочтительным является способ в соответствии с настоящим изобретением, в котором значения K_d , а также значения K_{on} и K_{off} , могут быть измерены для указанного ТКР, предпочтительно с уровнем чувствительности для K_d между 1×10^{-10} М и 1×10^{-3} М, где чувствительность может регулироваться концентрацией аналита.

В качестве одного предпочтительного примера аффинность измеряют с помощью серий разведений аналита 1:2, начиная с 500 нМ, или с помощью серий разведений аналита в соотношении $1/\sqrt{10}$, начиная с 500 нМ. В качестве одного предпочтительного примера комплексы пептидного лиганда и молекулы МНС используются в параллельных аналитических реакциях в разных концентрациях.

В еще одном другом важном аспекте способа в соответствии с настоящим изобретением указанный способ дополнительно включает этап измерения активации Т-клеток, включающей ТКР и комплекс связывающегося с ТКР пептидного лиганда и молекулы МНС, который связывается с указанным ТКР. Способы выявления такой активации Т-клеток за счет связывания, в частности, «специфического» связывания рМНС с ТКР, известны из уровня техники. В

настоящем изобретении в качестве примера проводили анализы совместной инкубации с нагруженными пептидами клетками-мишенями, эффекторными клетками линии Jurkat и bs-868Z11-CD3 в шести разных концентрациях и корреляцию измеренной аффинности для пептидных лигандов из библиотеки с перебором всех возможных аминокислот в определенном положении пептида для оптимизации последовательности с самой низкой концентрацией bsTKP, необходимой для индукции 3-кратного увеличения люминесценции по отношению к фону, принимали за пороговое значение.

Еще одним другим важным аспектом изобретения является способ обнаружения или получения специфического аминокислотного связывающего мотива для ТКР, включающий осуществление способа в соответствии с настоящим изобретением согласно настоящему описанию, в котором предварительно выбирают ТКР, для которого следует выявить или получить специфический аминокислотный связывающий мотив. Способ включает а) обеспечение стабилизированной подходящим образом молекулы МНС, где указанная молекула МНС включает по меньшей мере один искусственно введенный ковалентный мостик между аминокислотами домена альфа-1 и аминокислотами домена альфа-2 указанной стабилизированной молекулы МНС в случае молекулы МНС I, и по меньшей мере один искусственно введенный ковалентный мостик между аминокислотами домена альфа-1 и аминокислотами домена бета-1 указанной стабилизированной молекулы МНС в случае молекулы МНС II, б) контактирование указанной стабилизированной подходящим образом молекулы МНС с множеством ее пептидных лигандов в целях получения комплексов пептидного лиганда и молекулы МНС (pMHC), и в) скрининг указанных комплексов молекулы pMHC на наличие связывания с ТКР при использовании указанного предварительно выбранного ТКР. На дополнительном этапе определяют и – необязательно и преимущественно – сравнивают аминокислотные последовательности тех пептидных лигандов в указанных комплексах пептидного лиганда и молекулы МНС, для которых было обнаружено связывание с ТКР, в результате чего идентифицируется специфический аминокислотный связывающий мотив для указанного предварительно выбранного ТКР.

Один дополнительный вариант осуществления включает мутагенез конкретной аминокислотной последовательности после ее идентификации и контактирование

указанных пептидов с мутацией со стабилизированной подходящим образом молекулой МНС и скрининг указанных комплексов молекулы рМНС на ТКР-связывание с предварительно выбранным ТКР для получения аминокислотного связывающего мотива для указанного предварительно выбранного ТКР. Мутагенез пептидов может быть легко осуществлен, например, за счет синтеза пептидов с мутацией или химической модификации существующих аминокислот в соответствующих пептидных связующих. Мутагенез может также охватывать добавление маркеров или других групп к пептиду(ам) в целях идентификации эффективных для диагностики связывающих компонентов. Этот аспект связан со способом в соответствии с настоящим изобретением, описанным в данном контексте, причем этапы указанного способа повторяются с включением пептидного пула, состоящего из модифицированных последовательностей аминокислот для указанного предварительно выбранного ТКР, который был идентифицирован. Модификация может, кроме того, быть проведена с помощью одного из известных компьютерных алгоритмов и/или программ, используемых для подсчета параметров улучшенного связывания, основанных на модификациях последовательности(ей) аминокислот.

Одним из примеров является скрининг библиотеки комплексов рМНС, в которую входят пептиды, полученные по указанному способу, в отношении предварительно выбранных ТКР для связывания с ТКР с помощью биослойной интерферометрии (BLI) согласно настоящему раскрытию, причем для указанного ТКР были выявлены более сильные взаимодействия связывания, чем подходящий для способа порог чувствительности, составляющий K_d $1,0 \times 10^{-5}$ М, с измеренными значениями K_d в диапазоне от $3,7 \times 10^{-9}$ М до $7,2 \times 10^{-6}$ М, или для указанного ТКР не были выявлены взаимодействия связывания, если они были слабее, чем порог чувствительности. В указанном варианте осуществления настоящее изобретение демонстрирует особенное усовершенствование по отношению к существующим способам, поскольку получение комплексов рМНС со стабилизированной подходящим образом молекулой МНС позволяет получить предсказуемое количество рМНС, тем самым повышая точность измерения уровня K_d по сравнению с существующими способами (Фигура 5).

В одном дополнительном варианте осуществления совокупность пептидных лигандов, в основном, состоит из известных пептидных лигандов из

иммунопептидома, идентифицированных, например, с помощью масс-спектрометрии, причем предварительно выбранный ТКР подвергается скринингу на ТКР-связывание, чтобы напрямую идентифицировать существующие перекрестно реагирующие пептидные лиганды для указанного ТКР. Предпочтительным является способ в соответствии с настоящим вариантом осуществления, в котором число различных пептидов включает по меньшей мере примерно 1500 различных связывающихся с МНС пептидов, предпочтительно по меньшей мере примерно 5000 различных связывающихся с МНС пептидов, которые подвергаются параллельному измерению.

В еще одном важном аспекте изобретения предложен способ обнаружения или определения перекрестного взаимодействия ТКР, включающий осуществление способа обнаружения или получения специфического аминокислотного связывающего мотива для ТКР, описанного в данном контексте, и дополнительный этап определения и сравнения аминокислотных последовательностей тех пептидных лигандов в указанных комплексах пептидного лиганда и молекулы МНС, для которых было выявлено связывание с ТКР, за счет чего идентифицируется перекрестное взаимодействие указанного ТКР. Этот аспект позволяет обнаружить варианты пептида, которые распознаются отдельным ТКР.

В еще одном важном аспекте изобретения предложен способ обнаружения или определения перекрестного взаимодействия ТКР, включающий осуществление способа скрининга на комплексы связывающихся с ТКР пептидных лигандов с молекулами МНС на связывание с ТКР в соответствии с настоящим изобретением согласно описанному в данном контексте, включая предварительно выбранный ТКР, и дополнительный этап определения и сравнения аминокислотных последовательностей тех пептидных лигандов в указанных комплексах пептидного лиганда и молекулы МНС, для которых было выявлено связывание с ТКР, за счет чего идентифицируется перекрестное взаимодействие указанного ТКР. Этот аспект позволяет также обнаружить варианты пептида, которые распознаются отдельным ТКР.

Одним его примером является идентификация перекрестно реагирующего пептидного лиганда на основании аминокислотного связывающего мотива, предварительно определенного с помощью скрининга библиотеки комплексов

полученных путем мутагенеза рМНС с предварительно выбранным ТКР на связывание с ТКР в соответствии с настоящим изобретением, и поиском подходящего пептидного лиганда в банке данных известных или предполагаемых пептидных лигандов.

В еще одном важном аспекте изобретения предложен способ обнаружения или определения перекрестного взаимодействия комплекса пептидного лиганда и молекулы МНС, включающий осуществление способа скрининга на комплексы связывающихся с ТКР пептидных лигандов с молекулами МНС на связывание с ТКР в соответствии с настоящим изобретением согласно описанному в данном контексте, включая предварительно выбранный рМНС, и дополнительный этап идентификации тех ТКР, для которых было выявлено связывание с рМНС, за счет чего идентифицируется перекрестное взаимодействие указанного ТКР. Этот аспект позволяет обнаружить варианты ТКР, которые распознают отдельный пептид.

В данных аспектах, чтобы выявить связывание рМНС с предварительно выбранным ТКР, могут использоваться те же самые способы, что и описанные выше. Тем не менее, поскольку требование, чтобы связывание с ТКР было специфическим, не является обязательным, пороговое значение и чувствительность измерения и оценка связывания не должны быть оптимальными, и должны выбираться как наиболее пригодные в соответствующих обстоятельствах, что будет понятно специалисту данной области.

В другом важном аспекте способов в соответствии с настоящим изобретением указанные способы могут дополнительно включать этап измерения показателей активации Т-клеток, включающей ТКР и комплекс связывающегося с ТКР пептидного лиганда и молекулы МНС, который связывается с указанным ТКР. Способы выявления такой активации Т-клеток за счет связывания, в частности, «специфического» связывания рМНС с ТКР, известны из уровня техники. В настоящем изобретении в качестве примера проводили анализы совместной инкубации с нагруженными пептидами клетками-мишенями, эффекторными клетками линии Jurkat и bs-868Z11-CD3 в шести разных концентрациях и корреляцию измеренной аффинности для пептидных лигандов из библиотеки с перебором всех возможных аминокислот в определенном положении пептида для оптимизации последовательности с самой низкой концентрацией bsТКР,

необходимой для индукции 3-кратного увеличения люминесценции по отношению к фону, принимали за пороговое значение.

Другой важный аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, включающей стабилизированную подходящим образом молекулу МНС, в котором указанная молекула МНС включает по меньшей мере один искусственно введенный ковалентный мостик между аминокислотами домена альфа-1 и аминокислотами домена альфа-2 указанной стабилизированной молекулы МНС в случае молекулы МНС I, и/или по меньшей мере один искусственно введенный ковалентный мостик между двумя аминокислотами домена альфа-1 указанной стабилизированной молекулы МНС в случае молекулы МНС I, и/или по меньшей мере один искусственно введенный ковалентный мостик между аминокислотами домена альфа-1 и аминокислотами домена бета-1 указанной стабилизированной молекулы МНС в случае МНС II, причем указанная стабилизированная молекула МНС связана с микрогранулой, волокном, наночастицей или другим подходящим носителем.

В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция включает стабилизированную молекулу МНС в соответствии со вторым аспектом изобретения, как это описано выше во втором аспекте изобретения. Предпочтительно, если стабилизированная молекула МНС, включенная в фармацевтическую композицию, не включает трансмембранный домен.

Фармацевтическая композиция, кроме того, включает подходящие буферы и/или вспомогательные вещества. Предпочтительно, если указанная фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением может дополнительно включать одну или комбинацию нескольких и/или хронологическую последовательность данных костимуляторных молекул, таких как антитело к CD28 или к 41BB.

Другой важный аспект настоящего изобретения относится к применению фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением в способе в соответствии с предложенным изобретением как изложено в данном документе.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция включена в вакцину. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция включена в вакцину для применения в производстве лекарственного препарата. Предпочтительно, если вакцина используется для предупреждения ракового заболевания. Еще более предпочтительно, если вакцина после введения субъекту, нуждающемуся в этом, вызывает или инициирует у субъекта ответ Т-клеток. Предпочтительно, если стабилизированная молекула МНС, включенная в фармацевтическую композицию вакцины, не включает трансмембранный домен.

Другой важный аспект настоящего изобретения относится к способу усовершенствованной персонализированной идентификации Т-клеточных рецепторов, или активации Т-клеток, и/или терапевтическим средствам на основе Т-клеток для лечения пролиферативных заболеваний, таких как рак, за счет стимуляции комплексами рМНС для получения лекарственных препаратов на основе клеток для конкретного пациента. Такая стимуляция может быть основана на комплексах рМНС, нагруженных пептидами, идентифицированными при получении /предоставлении образца раковой ткани и/или раковых клеток указанного пациента, получении/предоставлении образца нормальной ткани и/или клеток указанного пациента, выявлении пептидов, презентируемых в контексте МНС в указанном(ых) образце(ах) с помощью платформы XPRESIDENT® или равноценного способа, и определении последовательности(ей) по меньшей мере одного из указанных пептидов, факультативно, выявлении экспрессии генов, кодирующих указанные пептиды, которые были определены, выявлении уровня презентации МНС /числа пептидов, выявленных в указанном(ых) образце(ах), факультативно, сравнении уровня презентации указанной молекулой МНС /числа пептидов, выявленных в указанной опухолевой ткани и/или образцах клеток опухоли и образцах нормальной ткани и/или клеток, скрининге на оптимизированный комплекс пептидного лиганда, связывающегося с ТКР, и молекулы МНС, включающем способ в соответствии с настоящим изобретением. Указанные Т-клетки включают такие клетки, которые были получены непосредственно у указанного пациента, которые могут быть введены ему вновь после проведения указанной стимуляции в виде лекарственного препарата на основе клеток. Указанная стимуляция может включать использование заранее изготовленных каркасов для стимуляции, полученных с помощью иммобилизации

стабилизированной подходящим образом молекулы МНС, предпочтительно полученной в условиях для клинического применения (например, по правилам GMP), на носителе, например, волокнах или микрогранулах, которые затем нагружаются пептидом по необходимости, к примеру, непосредственно в клиническом центре. Данные каркасы для стимуляции могут также включать другие костимуляторные молекулы (например, антитела к CD28, антитела к 41BB), иммобилизованные вместе со стабилизированной подходящим образом молекулой МНС.

В предпочтительном аспекте предложенного выше способа указанный пептид, например, пептид, специфический для определенного вида рака или другого вида пролиферативного заболевания, уже известен группе, осуществляющей процедуру благодаря уже произведенной идентификации у другого пациента или пациентов. Указанный пептид может быть, таким образом, быстро выбран и получен для другого пациента, больного тем же самым видом рака, нагружен на указанный каркас для стимуляции и использован для производства лекарственного препарата на основе клеток.

В предпочтительном аспекте предложенного выше способа указанный процесс активации Т-клеток, и/или терапевтическое средство на основе Т-клеток, полученных непосредственно от указанного пациента, включает также трансдукцию Т-клеток в целях экспрессии опухоль-специфического экзогенного Т-клеточного рецептора (ТКР), и, факультативно, подходящее приготовление лекарственной формы полученного в результате терапевтического средства на основе Т-клеток.

Понятие «Т-клетка» относится к Т-лимфоцитам, как это определено в уровне техники и подразумевает включение рекомбинантных Т-клеток. В соответствии с использованием в настоящем контексте понятие «Т-клеточный рецептор» и «ТКР» относятся к молекуле, находящейся на поверхности Т-клетки, отвечающей за распознавание антигенов, которые связываются с молекулами МНС, и обыкновенно относятся к молекуле, способной распознавать пептид, когда он презентруется молекулой МНС. Эта молекула является гетеродимером, включающим α - и β -цепи (или, по выбору, γ - и δ -цепи) или конструкцией ТКР, которая генерирует сигналы. ТКР по настоящему изобретению является гибридным

ТКР, включающим последовательности других биологических видов. Например, поскольку мышинные ТКР экспрессируются в Т-клетках человека более эффективно, чем человеческие ТКР, данный ТКР включает переменную область человека и константную область мыши. Данное понятие охватывает также молекулы растворимого ТКР и их производные, при условии, что они включают участки, определяющие комплементарность (CDR), необходимые для связывания.

Технология XPRESIDENT® описана, помимо прочего, в патентных заявках WO 03/100432, WO 2005/076009, и WO 2011/128448, которые включены в данное описание во всей полноте посредством ссылки.

В предпочтительном аспекте описанного выше способа указанная разработка усовершенствованных персонализированных Т-клеточных рецепторов, Т-клеток и/или терапевтических средств на основе Т-клеток для лечения пролиферативных заболеваний дополнительно включает трансдукцию аутологичных (собственных) Т-клеток пациента для экспрессии опухоль-специфического экзогенного Т-клеточного рецептора (ТКР), и, факультативно, подходящее приготовление лекарственной формы полученного в результате терапевтического средства на основе Т-клеток.

Авторы настоящего изобретения демонстрируют, что дисульфид-модифицированная молекула HLA-A*02:01 в качестве примера может быть легко получена в виде стабильного и пустого мономера МНС, нагруженного лигандными пептидами после рефолдинга, и использоваться для получения данных по аффинности, хорошо согласующихся с данными, полученными при использовании комплексов рМНС дикого типа.

Как дисульфид-модифицированные молекулы HLA-A*02:01, так и биспецифические ТКР могут использоваться совместно в рамках скринингов на основе BLI для измерения аффинности связывания рМНС-bsТКР, платформы с намного более высокой производительностью, чем в случае измерений с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса, используемого в настоящее время для таких взаимодействий согласно литературе. Дисульфид-модифицированные молекулы HLA-A*02:01 являются частью этой платформы, обеспечивающей не только надежное, но и высокопроизводительное получение рМНС. Данная платформа могла быть также полезна для анализа других биопрепаратов, если они нацелены на рМНС, таких как моноклональные антитела или биспецифики

(например, BITE). Уровни аффинности связывания рМНС-bsTKP коррелировали с анализами клеток, если оба метода осуществлялись авторами изобретения с функциональным биспецифическим активатором Т-клеток. Насколько это известно авторам изобретения, это первый глубокий анализ связи между аффинностью связывания рМНС-bsTCR и активностью *in vitro* для широкого спектра аффинностей. В сравнении с другими видами скрининга клеток платформа для скрининга аффинности была более легкой в использовании и выполняла анализ быстрее, что квалифицирует ее как инструмент для скрининга на ранних стадиях. Благодаря способности дисульфид-модифицированных молекул HLA-A*02:01 в соответствии с ожиданиями презентировать даже такие низкоаффинные пептидные лиганды как комплексы с рМНС, авторы изобретения могли с точностью измерить аффинность связывания рМНС-bsTKP без необходимости учитывать вариации, встречающиеся в подходах по загрузке экзогенных пептидов, что исключает потери потенциально ценной информации. Авторы изобретения считают, что простота в применении настоящей платформы для анализа аффинности будет способствовать разработке безопасных и эффективных биспецифических молекул на основе Т-клеточных рецепторов начиная с ранних стадий.

В качестве примера авторы изобретения продемонстрировали, что возможно быстрое получение наборов данных по аффинности связывания рМНС-bsTKP и экстраполировать из них мотивы для поиска перекрестного взаимодействия. Руководствуясь платформой авторов изобретения XPRESIDENT® на основе HLA-пептидомики, мотивы для поиска могут использоваться для идентификации потенциально перекрестно реагирующих пептидных лигандов. В настоящем осуществлении этой стратегии авторам изобретения удалось идентифицировать широкий спектр пептидов, которые легко распознаются bsTKP и способны индуцировать активацию Т-клеток, имея консенсус последовательности в сравнении с исходной мишенью на таком низком уровне, который составляет одно положение из девяти.

Эта впечатляющая инновационная технология могла бы также привести к скринингам всего известного иммунопептидома: библиотеки рМНС такого масштаба в настоящий момент доступны только для дрожжевого дисплея при использовании библиотек МНС и одноцепочечных пептидов со случайными

мутациями (32, 33). Являясь подходящими для использования для широкого анализа ТКР, они намного более сложны в применении и характеризуются менее предсказуемыми составами пептидных лигандов, чем пептидные микроматрицы, обычно используемые в разработках антител. В связи с их стабильностью и процессом загрузки пептидов, не требующим больших затрат, дисульфид-модифицированные молекулы HLA-A*02:01 по настоящему изобретению могут быть идеальным выбором для создания микроматриц рМНС высокой сложности в будущем, например, при комбинации широкомасштабного покрытия пустых молекул МНС и высокопроизводительной технологии современных струйных принтеров для пептидных микроматриц.

Молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС) I класса презентируют короткие пептидные лиганды на их клеточной поверхности для «опроса» цитотоксическими CD8⁺ Т-клетками. Комплексы МНС I класса, презентирующие опухоль-ассоциированные пептиды (ТУМАР), являются ключевыми мишенями разрабатываемых сейчас подходов раковой иммунотерапии, что делает их важным компонентом как для скрининга эффективности, так и безопасности. Без пептидного лиганда комплексы МНС I класса нестабильны и быстро распадаются, делая трудоемким получение растворимых мономеров для аналитических целей. Авторы изобретения разработали молекулы HLA-A*02:01, стабилизированные дисульфидной связью, которые обладают стабильностью в отсутствие пептида, но могут образовывать комплексы пептида и молекулы МНС с желаемыми лигандами в течение нескольких минут. Авторы изобретения иллюстрируют совпадения между сконструированными мутантами и вариантом дикого типа в отношении аффинности связывания ТКР дикого типа или созревших высокоаффинных ТКР. Авторы изобретения демонстрируют их потенциал в качестве аналитов в высокопроизводительных скринингах аффинности биспецифических молекул ТКР и получают универсальный связывающий мотив ТКР, чтобы идентифицировать нецелевые взаимодействия.

Другой аспект изобретения относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим стабилизированные молекулы МНС или их связывающиеся с пептидом фрагменты по второму аспекту изобретения, и векторам. Из уровня техники хорошо известно, что молекула МНС I включает все домены связывания с пептидом, т. е. домен альфа-1 и домен альфа-2 на одной полипептидной цепи, тогда как молекула МНС

II в естественных условиях включает домен альфа-1 и домен бета-1 на двух полипептидных цепях. Как было отмечено ранее, функциональная молекула МНС II может быть также представлена на отдельном пептиде за счет слияния домена бета-1 с доменом альфа-1. Соответственно, нуклеиновая кислота, кодирующая молекулы МНС I и II класса по изобретению, может кодировать один или два полипептида, или же два полипептида могут также кодироваться двумя отдельными нуклеиновыми кислотами.

Понятие «нуклеиновая кислота» в контексте данного изобретения относится к одно- или двухцепочечным олиго- или полимерам оснований дезоксирибонуклеотидов или рибонуклеотидов или их обоим. Мономеры-нуклеотиды состоят из азотистого основания, сахара из пяти атомов углерода (такого как, рибоза или 2'-дезоксирибоза, но не ограничиваясь ими), и из одной – трех фосфатных групп. Обычно нуклеиновая кислота образуется за счет фосфодиэфирных связей между отдельными мономерами-нуклеотидами. В контексте настоящего изобретения понятие нуклеиновой кислоты включает, но не ограничивается молекулами рибонуклеиновой кислоты (РНК) и дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), однако также включает синтетические формы нуклеиновых кислот, включающих другие виды связей (например, пептидные нуклеиновые кислоты, описанные в работе Nielsen и соавт. (Science 254:1497–1500, 1991). Обычно нуклеиновые кислоты являются одно- или двухцепочечными молекулами и состоят из встречающихся в природе нуклеотидов. Картина отдельной нити нуклеиновой кислоты также определяет (по меньшей мере частично) последовательность комплементарной нити. Нуклеиновая кислота может быть одно- или двухцепочечной, или может содержать фрагменты как двух-, так и одноцепочечных последовательностей. В качестве примера, молекулы двухцепочечной нуклеиновой кислоты могут иметь концы 3' или 5', и для них как таковых не требуется или не предполагается, чтобы они были полностью двухцепочечными на протяжении всей их длины. Нуклеиновая кислота может быть получена методами биологического, биохимического или химического синтеза или с помощью любого из методов, известного из уровня техники, в том числе методов амплификации и обратной транскрипции РНК, но не ограничиваясь ими. Понятие «нуклеиновая кислота» включает хромосомы или сегменты хромосом, векторы (например, векторы экспрессии), экспрессионные кассеты, голые ДНК- или РНК-полимеры, праймеры, зонды, кДНК, геномную ДНК, рекомбинантную ДНК, кРНК, мРНК тРНК, микроРНК (миРНК) или малую

интерферирующую РНК (siРНК). Нуклеиновая кислота может быть, например, одноцепочечной, двухцепочечной или трехцепочечной, и она не ограничивается какой-либо конкретной длиной. Если не указано иное, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты включает или кодирует комплементарные последовательности в дополнение к любой последовательности, которая была указана в явном виде.

Другим аспектом изобретения является вектор, включающий нуклеиновую(ые) кислоты, кодирующую(ие) стабилизированные молекулы МНС или их связывающиеся с пептидом фрагменты по второму аспекту изобретения. Такие векторы могут быть использованы в стратегиях вакцинации, в которых желательна экспрессия вакцины в организме пациента. В таких случаях вектор может дополнительно кодировать белок или Т-клеточный рецептор, включающий его фрагменты, на который желательно вызвать иммунный ответ, предпочтительно ответ Т-клеток. Таким образом может быть гарантировано, что пептид-связывающий карман молекулы МНС, включающей вектор и экспрессируемой в клетках пациента, нагружен правильным пептидом. В качестве альтернативы молекула МНС может быть модифицирована, так чтобы включать пептид, содержащий Т-клеточный эпитоп в слитом белке. Обычно слияние пептида с молекулой МНС происходит за счет промежуточного пептидного линкера, позволяющего пептиду произвести связывание со связывающей бороздкой молекулы МНС.

Понятие «вектор» в контексте настоящего изобретения обозначает полинуклеотид, который кодирует интересующий белок или смесь, включающую полипептид(ы) и полинуклеотид, который кодирует интересующий белок, который в состоянии быть введенным или вводить белки и/или нуклеиновые кислоты, входящие в него, в клетку. Примеры векторов включают плазмиды, космиды, фаги, вирусы или искусственные хромосомы, но не ограничиваясь ими. Вектор применяется для введения в клетку-хозяина интересующего генного продукта, например, чужеродной или гетерологичной ДНК. Векторы могут включать полинуклеотидные последовательности «репликон», которые упрощают автономную репликацию вектора в клетке-хозяине. Чужеродная ДНК определена как гетерологичная ДНК, которая является ДНК, не встречающейся на клетке-хозяине в естественных условиях, которая, к примеру, реплицирует векторную молекулу, кодирует маркер,

подвергающийся отбору или скринингу, или кодирует трансген. Находясь в клетке-хозяине, вектор может реплицироваться независимо от или согласованно с хромосомной ДНК хозяина, и могут быть получены несколько копий вектора и встроенной в него ДНК. Кроме того, вектор может также содержать необходимые элементы, которые позволяют встроенной ДНК транскрибироваться в молекулу мРНК или же иным способом вызывать репликацию встроенной ДНК во множество копий РНК. Векторы, кроме того, могут включать «последовательности контроля экспрессии», которые регулируют экспрессию интересующего гена. Обычно последовательности контроля экспрессии являются полипептидами или полинуклеотидами, такими как промоторы, энхансеры, сайленсеры, инсуляторы или репрессоры. В векторе, включающем более чем один полинуклеотид, кодирующий один или более интересующих генных продуктов, контроль экспрессии может осуществляться совместно или отдельно одной или несколькими последовательностями контроля экспрессии. Более конкретно, каждый полинуклеотид, включенный в вектор, может контролироваться отдельной последовательностью контроля экспрессии или все полинуклеотиды, включенные в вектор, могут контролироваться одной последовательностью контроля экспрессии. Полинуклеотиды, включенные в один вектор, контролируемый отдельной последовательностью контроля экспрессии, могут образовывать открытую рамку считывания. Некоторые векторы экспрессии дополнительно содержат элементы последовательности, смежные со встроенной ДНК, что увеличивает время полужизни экспрессированной мРНК и/или позволяет транслировать мРНК в белковую молекулу. Множество молекул мРНК и полипептида, кодируемых встроенной ДНК, могут быть быстро синтезированы таким образом. Такие векторы могут включать регуляторные элементы, такие как промотор, энхансер, терминатор и тому подобные, чтобы вызывать или управлять экспрессией указанного полипептида при введении субъекту. Примеры промоторов и энхансеров, используемых в векторе экспрессии для клеток животных, включают ранний промотор и энхансер SV40 (Mizukami T. et al. 1987), промотор LTR и энхансер вируса мышинного лейкоза Молони (Kuwana Y et al. 1987), промотор (Mason JO et al. 1985) и энхансер (Gillies SD et al. 1983) H-цепи иммуноглобулина и тому подобное. Возможно использование любого вектора экспрессии клетки животного, при условии, что возможно введение и экспрессия гена, кодирующего С-область антител человека. Примеры подходящих векторов включают pAGE107 (Miyaji H et al. 1990), pAGE103 (Mizukami T et al. 1987), pHSG274 (Brady G et al. 1984),

pKCR (O'Hare K et al. 1981), pSG1 бета-d2-4-(Miyaji H et al. 1990) и тому подобное. Другие примеры плазмид включают реплицирующиеся плазмиды, включающие точку начала репликации, или интегративные плазмиды, например, pUC, pcDNA, pBR.

Вкратце, изобретение относится к следующим пунктам.

Пункт 1. Способ скрининга на связывающийся с ТКР комплекс пептидного лиганда и молекулы МНС, включающий следующие этапы: а) обеспечение стабилизированной подходящим образом молекулы МНС, где указанная молекула МНС включает по меньшей мере один искусственно введенный ковалентный мостик между аминокислотами домена альфа-1 и аминокислотами домена альфа-2 указанной стабилизированной молекулы МНС в случае молекулы МНС I, и по меньшей мере один искусственно введенный ковалентный мостик между аминокислотами домена альфа-1 и аминокислотами домена бета-1 указанной стабилизированной молекулы МНС в случае молекулы МНС II, б) контактирование указанной стабилизированной подходящим образом молекулы МНС с множеством ее пептидных лигандов в целях получения комплексов пептидного лиганда и молекулы МНС (pMHC), и в) скрининг указанных комплексов молекулы pMHC на наличие связывания с ТКР.

Пункт 2. Способ в соответствии с п. 1, в котором указанная молекула МНС является HLA или мультимером HLA, МНС I или МНС II, выбранным из группы, состоящей из димера, тримера и тетрамера.

Пункт 3. Способ в соответствии с п. 1 или п. 2, в котором указанный по меньшей мере один искусственно введенный ковалентный мостик между аминокислотами выбран из дисульфидного мостика, введенного с помощью рекомбинантных технологий, введения не встречающихся в природе аминокислот, предназначенных для поперечной сшивки, введения аминокислот для фотосшивки и поперечных сшивок, введенных химическим путем.

Пункт 4. Способ в соответствии с любым из пп. 1–3, в котором указанный по меньшей мере один искусственно введенный ковалентный мостик между

аминокислотами введен между α -спиралями, например, за счет мутации тирозина в положении 84 и аланина в положении 139 в цистеин молекулы МНС I.

Пункт 5. Способ в соответствии с любым из пп. 1–4, в котором указанное множество пептидных лигандов включает по меньшей мере примерно 1500 различных связывающихся с МНС пептидов, предпочтительно по меньшей мере примерно 5000 различных связывающихся с молекулами МНС пептидов, более предпочтительно по меньшей мере примерно 15 000 различных связывающихся с молекулами МНС пептидов, и, наиболее предпочтительно, препарат на основе иммунопептидома, в который входят по меньшей мере примерно 150 000 связывающихся с молекулами МНС пептидов.

Пункт 6. Способ в соответствии с любым из пп. 1–5, в котором указанное контактирование включает загрузку указанных связывающихся с молекулами МНС пептидов при температуре примерно от 4° С до 30° С, предпочтительно – при комнатной температуре.

Пункт 7. Способ в соответствии с любым из пп. 1–6, в котором указанные нагруженные молекулы комплекса HLA/пептид являются стабильными в течение более чем примерно 1 дня, и – предпочтительно – более чем 1 неделю при температуре примерно 4° С.

Пункт 8. Способ в соответствии с любым из пп. 1–7, в котором уровень чувствительности для скрининга аффинности связывания ТКР с комплексами рМНС выше, чем примерно $K_d 1,0 \times 10^{-9}$, предпочтительно – выше, чем примерно $K_d 1,0 \times 10^{-6}$ М, и – наиболее предпочтительно – выше, чем примерно $K_d 1,0 \times 10^{-3}$ М.

Пункт 9. Способ в соответствии с любым из пп. 1–8, в котором указанный ТКР выбран из природного ТКР, молекулы растворимого ТКР и ТКР-подобной молекулы, такой как bsTKR.

Пункт 10. Способ в соответствии с любым из пп. 1–9, в котором либо ТКР, либо молекула МНС надлежащим образом иммобилизована на твердой поверхности, такой как чип, биосенсор, предметное стекло или микрогранула.

Пункт 11. Способ в соответствии с любым из пп. 1–10, в котором указанный ТКР и/или молекула МНС не имеет/не имеют метки и/или маркера.

Пункт 12. Способ в соответствии с любым из пп. 1–11, в котором указанный способ осуществляется в формате высокопроизводительного скрининга.

Пункт 13. Способ обнаружения или получения специфического аминокислотного связывающего мотива для ТКР, включающий осуществление способа в соответствии с любым из пп. 1–12, включающий предварительно выбранный ТКР, и дополнительный этап определения и сравнения аминокислотных последовательностей тех пептидных лигандов в указанных комплексах пептидного лиганда и молекулы МНС, для которых было выявлено связывание с ТКР, за счет чего идентифицируется специфический аминокислотный связывающий мотив для указанного предварительно выбранного ТКР.

Пункт 14. Способ в соответствии с п. 13, в котором указанные комплексы пептидного лиганда и молекулы МНС используются в параллельных аналитических реакциях в разных концентрациях.

Пункт 15. Способ в соответствии с п. 13 или п. 14, в котором этапы указанного способа повторяются с включением пула пептидов, состоящих из модифицированных аминокислотных связывающих мотивов для указанного предварительно выбранного ТКР, который был идентифицирован.

Пункт 16. Способ обнаружения или определения перекрестного взаимодействия ТКР, включающий осуществление способа в соответствии с п. 15 и дополнительного этапа определения и сравнения аминокислотных последовательностей тех пептидных лигандов в указанных комплексах пептидного лиганда и молекулы МНС, для которых было выявлено связывание с ТКР, за счет чего идентифицируется перекрестное взаимодействие указанного ТКР.

Пункт 17. Способ обнаружения или определения перекрестного взаимодействия ТКР, включающий осуществление способа в соответствии с любым из пп. 1–12, включающий предварительно выбранный ТКР, и дополнительного этапа

определения и сравнения аминокислотных последовательностей тех пептидных лигандов в указанных комплексах пептидного лиганда и молекулы МНС, для которых было выявлено связывание с ТКР, за счет чего идентифицируется перекрестное взаимодействие указанного ТКР.

Пункт 18. Способ в соответствии с любым из пп. 1–17, дополнительно включающий этап измерения показателей активации Т-клеток, включающей ТКР и комплекс связывающегося с ТКР пептидного лиганда и молекулы МНС, который связывается с указанным ТКР.

Пункт 19. Способ активации и/или стимуляции и/или экспансии популяции клеток (например, популяции специфических Т-клеток) с помощью комплекса пептидного лиганда и молекулы МНС, несущего стимуляционный каркас, в котором указанный каркас включает комплекс пептидного лиганда и молекулы МНС, иммобилизованный на носителе, например, микрогранулах, волокнах, наночастицах или любом носителе, способном переносить данный комплекс, где подходящим образом стабилизированный комплекс МНС может быть иммобилизован на носитель и каркас храниться в таком состоянии в течение продолжительного периода времени до добавления пептидного лиганда, повышая тем самым практическую выполнимость такого стимуляционного каркаса, имитирующего антиген-презентирующие клетки в исследованиях или клинической практике.

Пункт 20. Фармацевтическая композиция, включающая стабилизированную подходящим образом молекулу МНС, в которой указанная молекула МНС включает по меньшей мере один искусственно введенный ковалентный мостик между аминокислотами домена альфа-1 и аминокислотами домена альфа-2 указанной стабилизированной молекулы МНС в случае молекулы МНС I, и по меньшей мере один искусственно введенный ковалентный мостик между аминокислотами домена альфа-1 и аминокислотами домена бета-1 указанной стабилизированной молекулы МНС в случае МНС II, причем указанная стабилизированная молекула МНС связана с микрогранулой, волокном, наночастицей или другим подходящим носителем.

Пункт 21. Фармацевтическая композиция в соответствии с п. 20, дополнительно включающая одну или комбинацию нескольких костимуляторных молекул и/или хронологическую последовательность данных костимуляторных молекул, таких как, например, антитело к CD28 или антитело к 41BB.

Пункт 22. Фармацевтическая композиция в соответствии с п. 20 или п. 21, в которой указанная стабилизированная молекула МНС может храниться в течение продолжительного периода времени до добавления пептидного лиганда, например, при комнатной температуре или при 4° С или примерно при -80° С.

Пункт 23. Применение фармацевтической композиции в соответствии с любым из пп. 20–22 в способе в соответствии с любым из пп. 1–19.

Настоящее изобретение будет далее описано с помощью примеров со ссылкой на сопровождающие фигуры и последовательности, что не подразумевает ограничения изобретения. В соответствии с целями настоящего изобретения все цитируемые источники включены в данное описание во всей полноте путем ссылки.

Перечень фигур

На Фигуре 1 представлен обзор получения дисульфид-стабилизированного HLA-A*02:01 и использование для измерения аффинности. (а) Экспрессионные плазмиды тяжелой цепи и β_2m трансфицировали в *E. coli*, а интересующие белки экспрессировались в тельца включения. Мономеры HLA очищали с использованием эксклюзионной хроматографии. (б) Пустые дисульфид-модифицированные молекулы HLA-A*02:01 могут быть нагружены пептидными лигандами при инкубации при комнатной температуре. Для измерения аффинности их иммобилизовали на функционализированных биосенсорах, например, за счет взаимодействия биотин-стрептавидин, и использовали для регистрации ассоциации и диссоциации ТКР или ТКР-подобных молекул.

На Фигуре 2 представлено поведение ассоциации и диссоциации 1G4 TCR с различными мономерами МНС. Исходные данные показаны на Фигуре 2(а) и 2(б), подбор кривых – на Фигуре 2(в) и 2(г). Все измерения проводили в серийных разведениях аналита 1:2, начиная с 24 мкМ. (а) Кривая связывания ТКР 1G4 с

иммобилизованным ESO 9V Y84C/A139C HLA-A*02:01 pMHC. (б) Кривая связывания ТКР 1G4 с иммобилизованным ESO 9V WT-A*02:01 pMHC. (в) Кривая связывания ТКР 1G4 с иммобилизованным Y84C/A139C HLA-A*02:01. (г) Кривая связывания ТКР 1G4 с иммобилизованным SL9 Y84C/A139C HLA-A*02:01pMHC.

На Фигуре 3 показаны уровни аффинности SL9-специфического bsТКР bs-868Z11-CD3 с различными мономерами MHC и пептидными лигандами. (а) Кривая связывания bs-868Z11-CD3 с иммобилизованным SL9 Y84C/A139C HLA-A*02:01 pMHC. Исходные данные показаны на Фигуре 3(а) и 3(б), подбор кривых – на Фигуре 3(с) и 3(д). Измерения проводили в серийных разведениях аналита 1:2, начиная с 500 нМ. (б) Кривая связывания bs-868Z11-CD3 с иммобилизованным SL9 WT-A*02:01 pMHC. Исходные данные обозначены черным цветом, подбор кривых – красным. Измерения проводили в серийных разведениях аналита 1:2, начиная с 500 нМ. (в) Кривая связывания bs-868Z11-CD3 с иммобилизованным Y84C/A139C HLA-A*02:01. Измерения проводили в серийных разведениях аналита 1:2, начиная с 500 нМ. (г) Корреляция аффинностей, измеренных с помощью комплексов Y84C/A139C HLA-A*02:01pMHCs или WT-A*02:01 pMHC, полученных с помощью обмена под воздействием УФ-излучения. Значения K_d были нанесены на график для 140 различных пептидных лигандов, полученных при использовании обоих способов и измеренных во время последовательных экспериментов с хорошим подбором кривых. Значения K_d аппроксимировали, используя концентрации аналитов 500 нМ и 158 нМ. R^2 – это рассчитанный коэффициент корреляции, пунктирная линия представляет собой оптимальное соотношение.

На Фигуре 4 представлен связывающий мотив bs-868Z11-CD3, полученный при использовании комплекса Y84C/A139C HLA-A*02:01 – генерированной библиотеки аминокислотных последовательностей с мутациями в качестве растворимого аналита и иммобилизованного bsТКР. Значения K_d аппроксимировали, используя кривые из – по меньшей мере – одну и более концентраций аналита авторов изобретения, для включения кривых был необходим по меньшей мере один сигнал пика при 0,05 нм. Положения без аппроксимируемых кривых принимали за K_d , равное 5×10^{-6} М. Измерения проводили в серийных разведениях аналита $1/\sqrt{10}$, начиная с 500 нМ. (а) Тепловая карта аффинностей в зависимости от введенной аминокислоты и положения замен в пептидной последовательности. Белые клетки обозначают аминокислоту пептида дикого типа. (б) Визуализация связывающего

мотива в виде графика seq2logo. Размер букв обратно пропорционален измеренной аффинности для соответствующей аминокислоты в данном положении; расчет произведен при использовании обратного значения K_d , поделенного на 10^8 , и алгоритма PSSM-Logo. (в) Кривая связывания bs-868Z11-CD3 bsTKP с пептидом ALYNVLAKV (SEQ ID NO: 1), нагруженного Y84C/A139C HLA-A*02:01 pMHC. Измерения проводили в серийных разведениях аналита $1/\sqrt{10}$, начиная с 500 нМ.

На Фигуре 5 представлен результат анализа для совместной инкубации с пептидом, нагруженным на клетки-мишени, эффекторные клетки линии Jurkat и bs-868Z11-CD3 в шести различных концентрациях. (а) Измеренная кратность индукции в сравнении с фоном для клеток Jurkat, стимулированных при различных концентрациях bs-868Z11-CD3 в присутствии клеток-мишеней T2, нагруженных пептидом дикого типа SL9. (б) Корреляция измеренной аффинности для пептидных лигандов из библиотеки с перебором всех возможных аминокислот в определенном положении пептида для оптимизации последовательности с самой низкой концентрацией bsTKP, необходимой для индукции 3-кратного увеличения люминесценции по отношению к фону. Пептиды сгруппированы в 9 различных групп в зависимости от расположения места обмена в последовательности дикого типа. (в) Корреляция измеренной аффинности для пептидных лигандов из библиотеки с перебором всех возможных аминокислот в определенном положении пептида для оптимизации последовательности с их предсказанным по NetMHC рангом связывания с pMHC. Пептиды сгруппированы в 6 различных групп в зависимости от самой низкой концентрации bsTKP, необходимой для индукции 3-кратного увеличения люминесценции по отношению к фону. (г) Корреляция измеренных уровней аффинности для кандидатов в перекрестно реагирующие пептидные лиганды с самой низкой концентрацией bsTKP, необходимой для индукции 3-кратного увеличения люминесценции по отношению к фону. (д) Измеренная кратность индукции в сравнении с фоном для клеток Jurkat, стимулированных при различных концентрациях bs-868Z11-CD3 в присутствии клеток-мишеней T2, нагруженных пептидом ALYNVLAKV (SEQ ID NO: 1). На планках погрешностей представлены биологические трипликаты.

На Фигуре 6 представлено сравнение Y84C/A139C HLA-A*02:01 или полученных с помощью обмена под воздействием УФ-излучения комплексов WT-A*02:01 pMHC в качестве растворимых аналитов для измерений аффинности с иммобилизованным

bs-868Z11-CD3. Комплексы Y84C/A139C HLA-A*02:01 – слева, комплексы WT-A*02:01 – справа. Все измерения проводили в серийных разведениях аналита 1:2, начиная с 500 нМ.

На Фигуре 7 представлена кристаллическая структура ESO 9V Y84C/A139C HLA-A*02:01 и ESO 9V WT-A*02:01 в комплексе с 1G4. (а) Наложение структур дикого типа и Y84C/A139C HLA-A*02:01 с фокусом на ориентацию пептида и боковой цепи аминокислот. (б) Крупный план F-кармана и введенной дисульфидной связи между $\alpha 1$ и $\alpha 2$. (в) Наложение петель CDR 1G4, взаимодействующих с пептидом, и каркаса молекулы МНС. (г) Наложение обеих кристаллических структур, вид сбоку. На планках погрешностей представлены биологические трипликаты.

На Фигуре 8 представлен связывающий мотив bs-868Z11-CD3, полученный при использовании комплекса Y84C/A139C HLA-A*02:01, полученного из библиотеки с перебором всех возможных аминокислот в определенном положении пептида для оптимизации последовательности в качестве растворимого аналита и иммобилизованного bsТКР. Измерения проводили при использовании четырех концентраций растворимых аналитов. Положения без аппроксимируемых кривых принимали за K_d , равное 5×10^{-6} М. Полученный диапазон концентраций аналита при серийном разведении в соотношении 1/разведение аналита, начиная с 500 нМ. Тепловая карта аффинностей в зависимости от введенной аминокислоты и положения замена в пептидной последовательности.

На Фигуре 9 представлена иллюстрация конструкции bsТКР bs-868Z11-CD3. Домен 868Z11 основан на ТКР 868, реагирующем с пептидом SLYNTVATL и включает усиливающие аффинности мутации в областях CDR2 β (YYEEEE в YVRGEE) и CDR3 α (CAVRTNSGYALN до CAVRGAHDYALN), идентифицированных Varela-Rohena и соавт.(8). Домены V β и V α ТКР с улучшенной аффинностью были связаны за счет одноцепочечного линкера (GSADDAKKDAAKKDGKS) и дополнительно модифицированы за счет мутации в области V α 2 (F49S), придающей поверхностную устойчивость, для возможности экспрессии растворимой формы, как это описано у Aggen и соавт.(22). Чтобы создать молекулу bs-868Z11-CD3, данный домен 868Z11 scTv был слит с участком тяжелой цепи F(ab') гуманизированного антитела к CD3 через образованный из IgG2 шарнирный домен CH2 (APPVAG) с мутациями, приводящими к замене на цистеин в двух

положениях (C₂₂₆S и C₂₂₉S), встроенного для предотвращения образования гомодимеров F(ab')₂ во время экспрессии.

На Фигуре 10 представлен анализ эффективности обмена под воздействием УФ-излучения и результаты измерения с помощью Octet для 28 различных пептидов, выбранных из библиотеки с перебором всех возможных аминокислот в определенном положении пептида SLYNTVATL для оптимизации последовательности. (а) Левая ось: концентрация рМНС после обмена под воздействием УФ-излучения с 25 000 нг/мл УФ-чувствительного мономера рМНС, определенного с помощью антитела к β2m методом ELISA. Обозначенная точками линия представляет собой фоновый сигнал ELISA/УФ-обмен на основе УФ-обмена без пептида. На планках погрешностей представлены технические трипликаты. Правая ось: Соотношение ответов на связывание растворимых аналитов рМНС с иммобилизованным bs-868Z11-CD3 в системе Octet RED384. рМНС получали при использовании УФ-обмена или за счет загрузки комплекса пептида Y84C/A139C HLA-A*02:01. Соотношения вычислены с помощью деления ответа УФ-A*02:01 на ответ Y84C/A139C HLA-A*02:01 через 60 с после ассоциации с нагруженными подобным образом биосенсорами на антитела к F(ab). (б) Подробный подбор кривых для четырех пептидов с рейтингом согласно NetMHC 15 и выше. Комплексы Y84C/A139C HLA-A*02:01 – слева, комплексы WT-A*02:01 – справа. Все измерения проводили в серийных разведениях аналита 1:2, начиная с 500 нМ.

На Фигуре 11 представлено связывание нескольких различных ТКР и bsTKP bs-868Z11-CD3 с ненагруженным Y84C/A139C HLA-A*02:01 или нагруженным нерелевантным пептидом комплексом Y84C/A139C HLA-A*02:01. (а) Связывание трех различных, рестриктированных по HLA-A*02:01 растворимых ТКР, а также bs-868Z11-CD3 с функционально пустым комплексом Y84C/A139C HLA-A*02:01. Y84C/A139C HLA-A*02:01 был иммобилизован на стрептавидиновом сенсоре, каждый ТКР поставлялся в концентрации 1 мг/мл (20 мкМ в случае растворимых ТКР, 13,3 мкМ в случае bsTKP). (б) Связывание тех же ТКР с комплексом Y84C/A139C HLA-A*02:01, нагруженным нерелевантным пептидом.

На Фигуре 12 представлены измерения аффинности с помощью системы Octet для Y84C/A139C HLA-A*02:01 SLYNTVATL рМНС на иммобилизованном bs-868Z11-CD3

сразу же после проведения обмена и через 2 недели хранения при 4° С. Оба измерения проводили в серийных разведениях анализата 1:2, начиная с 277,8 нМ.

На Фигуре 13 представлено выравнивание множества последовательностей различных аллелей HLA и одного аллеля мыши. В выравнивании последовательностей выделены зоны для внедрения стабилизирующих аминокислотных замен. Данное выравнивание обеспечивает опытного специалиста основой для определения в каждом заданном аллеле HLA тех аминокислот, которые должны быть заменены для стабилизации молекулы MHC.

На Фигуре 14 представлены аффинности SL9-специфического bsTKP bs-868Z11-CD3 по отношению к комплексу pMHC с SL9, полученного с различными дисульфид-модифицированными комплексами HLA-A*02:01. Кривые связывания показывают ассоциацию bs-868Z11-CD3 и диссоциацию по отношению к иммобилизованному pMHC с SL9. Измерения проводили в серийных разведениях анализата 1:2, начиная с 500 нМ. Кривая связывания bs-868Z11-CD3 bsTKP с иммобилизованным комплексом SL9 WT-HLA*02:01 pMHC (график вверху слева). Кривая связывания bs-868Z11-CD3 bsTKP с иммобилизованным комплексом SL9 Y84C/A139C HLA*02:01 pMHC (график вверху справа). Кривая связывания bs-868Z11-CD3 bsTKP с иммобилизованным комплексом SL9 F22C/S71C HLA*02:01 (график внизу слева). Кривая связывания bs-868Z11-CD3 bsTKP с иммобилизованным комплексом SL9 F22C/S71C W51C/G175C HLA-A*02:01 pMHC (график внизу справа).

На Фигуре 15 представлены значения K_d высокоаффинного ТКР по отношению к различным комплексам pMHC. В каждом случае значение K_d молекулы WT-A*02:01 представлено на оси X, а значение K_d двух различных дисульфид-модифицированных молекул MHC HLA-A*02:01 представлен на оси y, и каждой точкой представлен один из различных пептидов, нагруженных на молекулу MHC.

Последовательности с SEQ ID No 1–5 и 16–325 демонстрируют пептидные последовательности, какие были использованы в приведенных ниже примерах.

Примеры

1. Синтез пептидов

Все пептиды были получены в собственной лаборатории при использовании стандартного способа Fmoc и синтезатора пептидов Syro II. Затем пептиды анализировали с помощью ВЭЖХ, и среднее значение их чистоты составило 74%. Пептиды, чувствительные к УФ излучению, содержали фоточувствительный структурный блок с остатком 2-нитрофениламино. Дипептид ГМ (глицин-метионин) был предоставлен компанией Bachem. Перед использованием пептиды растворяли в ДМСО (Sigma, кат. № 41640), 0,5% TFA (Sigma, кат. № T6508) при концентрациях в диапазоне от 2 мг/мл до 10 мг/мл в зависимости от желаемого вида использования.

2. Получение комплексов МНС методом рефолдинга и очистки

Рекомбинантные молекулы HLA-A*02:01 дикого типа (WT-A*02:01, SEQ ID NO: 322) или дисульфид-модифицированные тяжелые цепи HLA-A*02:01 с С-терминальными сигнальными последовательностями BirA и легкой цепью β_2m человека были получены в клетках *Escherichia coli* в качестве телец включения и очищены, как было описано ранее (2). Реакции рефолдинга комплекса HLA-A*02:01 проводили, как было описано ранее, с незначительными модификациями (Saini *et al* 2013). Вкратце, молекулы WT-A*02:01 или дисульфид-модифицированные тяжелые цепи HLA-A*02:01, легкую цепь β_2m и пептиды разводили в ренатурирующем буфере (100 mM Tris·Cl pH 8, 0,5 M аргинина, 2 mM ЭДТА, 0,5 mM окисленного глутатиона, 5 mM восстановленного глутатиона) и инкубировали в течение 2 – 8 дней при температуре 4°C с перемешиванием до концентрирования. Концентрированный белок очищали с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC) в 20 mM Tris-HCl, pH 8/150 mM NaCl в системе ÄKTAprime (GE Healthcare) с использованием колонки HiLoad 26/600 200 μ g (GE Healthcare). Фракцию пика сразу же концентрировали до 2000 мкг/мл, аликвотировали и замораживали при -80° C или же биотинилировали с помощью биотин-протеин-лигазы BirA (Avidity) в течение ночи при 4° C согласно инструкциям производителя и подвергали второй гелефильтрации до конечной концентрации 2000 мкг/мл, аликвотирования и хранения при -80° C.

Для получения комплексов пептид-MHC HLA-A*02:01 дикого типа 9-мерные (полной длины) пептиды или чувствительные к УФ-излучению 9-мерные пептиды (полной длины) добавляли в ренатурирующий буфер в концентрации 30 мкМ. Для получения пустых комплексов Y84C/A139C HLA-A*02:01 (SEQ ID NO: 323) дипептид ГМ добавляли в ренатурирующий буфер в концентрации 10 мМ. Для получения комплексов F22C/S71C HLA-A*02:01 (SEQ ID NO: 324) в ренатурирующий буфер не добавляли никакие пептиды. Для получения комплексов F22C/S71C W51C/G175C HLA-A*02:01 (SEQ ID NO: 325) в ренатурирующий буфер не добавляли никакие пептиды.

В Таблице 1 ниже представлены методы рефолдинга различных дисульфид-модифицированных молекул HLA-A*02:01 и молекулы ДТ-A*02:01:

	Метод рефолдинга		
	Пептид полной длины	Дипептид	Без пептида
HLA-A*02:01 дикого типа (SEQ ID NO: 322)	+	-	-
HLA-A*02:01 84/139 (SEQ ID NO: 323)	+	+	-
HLA-A*02:01 22/71 (SEQ ID NO: 324)	н. о.	н. о.	+
HLA-A*02:01 22/71 51/175 (SEQ ID NO: 325)	н. о.	н. о.	+

Таблица 1 +: Белок поддается денатурации; - белок не поддается денатурации.

3. Получение комплексов pMHC HLA-A*02:01, включающих пептидный обмен, при использовании обмена лигандами под воздействием УФ-излучения или пустых дисульфид-модифицированных молекул HLA-A*02:01

Реакции пептидного обмена с пептидами, расщепляемыми под воздействием УФ-излучения, проводили, как было описано ранее. Вкратце, желаемые нонамерные пептиды смешивали с биотинилированными, чувствительными к УФ-излучению

комплексами pMHC в молярном соотношении 100 к 1 и подвергали воздействию УФ лучей при длине волн 366 нм в течение не менее чем 30 минут (Camag).

Реакции загрузки пептидов с использованием пустых дисульфид-модифицированных комплексов молекул MHC HLA-A*02:01 производили путем добавления и смешивания желаемых пептидов не менее чем в молярном соотношении 100 к 1 с раствором мономера и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре.

4. Получение растворимых ТКР

Растворимые ТКР получали, как это было описано ранее (20). Вкратце, экспрессию конструкций, содержащих альфа- и бета-цепь ТКР, проводили в отдельности в клетках *Escherichia coli* в виде телец включения и очищали. Альфа-цепи ТКР имеют мутацию в положении 48 в виде замены треонина на цистеин, а бета-цепи ТКР – в положении 57 в виде замены серина на цистеин с образованием внутрицепочечной дисульфидной связи.

5. Разработка и получение bsTKP

Молекула bs-868Z11-CD3 была получена за счет связывания scTv 868Z11 с C-концом домена F(ab') гуманизированного антитела к CD3 (22, 23). Для этой цели V β -домен scTv был напрямую слит с верхней областью CH2, образованной из молекулы IgG2 человека (APPVAG, SEQ ID NO: 2). Мутации, приводящие к замене цистеина C₂₂₆S и C₂₂₉S в области шарнира предотвращает образование молекул F(ab)₂. Векторы экспрессии, активируемые ЦМВ человека, кодирующие описываемую выше конструкцию или легкую цепь гуманизированного антитела к CD3, были транзитивно трансфицированы в клетки ExpiCHO (Thermo). Через 12 супернатант обрабатывали с помощью тандемной хроматографии (белком L и препаративной эксклюзионной хроматографии, GE Biosciences), и высокочистые мономерные молекулы bsTKP переносили в PBS

6. Измерения параметров кинетики аффинности с помощью метода биослойной интерферометрии прибором OctetRED

Аффинность молекул pTKP или bsTKP для различных комплексов pMHC измеряли в системе OctetRED 384 (Pall Fortébio), используя кинетический анализ связывания или анализ связывания в стационарном состоянии. Все аналиты или лиганды

разводили до их конечной концентрации в кинетическом буфере (PBS, 0,1% БСА, 0,05% TWEEN 20), если не указано иное. Все биосенсоры смачивали в течение не менее 10 минут в кинетическом буфере до использования. Загрузка и измерения производили в планшетах с 384 лунками под наклоном (Pall Fortébio) со смещением датчика не менее чем на 40 мкл на 3 мм. Температура планшета была установлена на уровне 25° C, и скорость шейкера – 1000 об/мин. Чтобы была возможность межстадийной корректировки, фоновые уровни до фаз ассоциации и последующей фазы диссоциации определяли в одной и той же лунке. Кинетический буфер использовали в качестве буфера диссоциации с ДМСО в подходящей концентрации, который добавляли при необходимости для приведения в соответствие с составом анализата.

В случае иммобилизации pMHC для иммобилизации биотинилированных мономеров pMHC использовали стрептавидиновые биосенсоры «Dip and Read» (SA; Pall Fortébio, Кат. № 18–5021) с предполагаемой концентрацией 25 мкг/мл в течение 60 секунд с последующей фазой определения фонового уровня в течение 60 секунд и фазами ассоциации и диссоциации, по 60 секунд каждая, если не указано иное.

В случае иммобилизации bsTKP использовали биосенсоры «Dip and Read» на основе антител Fab-CH1 человека 2-го поколения (FAB2G; Pall Fortébio, Кат. № 18-5127) для иммобилизации молекул bsTKP с концентрацией 100 мкг/мл в течение 60 секунд с последующей фазой фонового уровня в течение 15 секунд и фазами ассоциации и диссоциации, по 60 секунд каждая, если не указано иное. Биосенсоры FAB2G регенерировали вплоть до 4 раз за счет инкубации нагруженного биосенсора в течение 5 секунд каждый раз в 10 мМ глицина при уровне pH 1,5, а в кинетическом буфере – три раза подряд. Предварительное кондиционирование FAB2G осуществляли тем же способом до первой иммобилизации лигандов.

Все сенсограммы анализировали с помощью программы «Data Analysis HT» версии 10.0.3.7 (Pall Fortébio) для прибора OctetRED. Исходные данные сенсора выравнивали на оси Y, нанося данные к концу определения фонового уровня, и межстадийную корректировку использовали для выравнивания начала диссоциации к концу фазы ассоциации. Фильтр Савицкого-Голея не применяли.

Полученные в результате сенсограммы аппроксимировали, подставляя данные в модель кинетического связывания Лангмюра 1:1.

7. Линии клеток

Клеточная линия T2 с дефицитом TAP, экспрессирующая HLA-A*02:01, была получена из ATCC (CRL-1992), и ее культивировали в среде RPMI Medium 1640 GlutaMAX™ (Thermo Fisher, кат. № 61870010) с добавлением 10% инактивированной нагреванием эмбриональной телячьей сыворотки (Life Technologies, кат. № 10270106) и антибиотиков пенициллина и стрептомицина (Biozym, кат. № 882082, каждого по 100 мкг мл⁻¹) вплоть до числа пассажей 16, если это было необходимо. Клеточная линия GloResponse™ NFAT-luc2 Jurkat была получена из компании Promega (кат. № CS1764) на пассаже 6, и ее культивировали в среде RPMI Medium 1640 GlutaMAX™ (Thermo Fisher, кат. № 61870010) с добавлением 10% инактивированной нагреванием эмбриональной телячьей сыворотки (Life Technologies, кат. № 10270106), 1% пирувата натрия (C.C.Pro, кат. № Z-20M) и антибиотиков: гигромицина В (Merck Millipore, кат. № 400052, 200 мкг/мл), пенициллина и стрептомицина (Biozym, кат. № 882082, каждого по 100 мкг/мл) вплоть до числа пассажей 14, если это было необходимо.

8. Анализ активации Т-клеток

Анализ активации Т-клеток при использовании линии клеток GloResponse™ NFAT-luc2 Jurkat и нагруженных пептидом клеток-мишеней T2 проводили в соответствии с указаниями производителя. Вкратце, клетки T2 собирали из перевиваемой культуры клеток, промывали и ресуспендировали в питательной среде T2 с концентрацией $3,3 \times 10^6$ клеток/мл и переносили в 96-луночные планшеты с круглым дном (Corning costar®, кат. № 3799). Пептид в ДМСО, 0,5% TFA добавляли до конечной концентрации 100 нМ, и суспензию инкубировали в течение 2 – 3 часов при 37° С, 5% CO₂. bsTKP, перенесенный в PBS, разводили в питательной среде T2 до желаемой концентрации, и по 25 мкл соответствующего разведенного раствора распределяли в белые 96-луночные планшеты с плоским дном (Brand, кат. № 781965). Клетки GloResponse™ NFAT-luc2 Jurkat собирали из перевиваемой культуры клеток, промывали и ресуспендировали в питательной среде T2 с концентрацией $3,0 \times 10^6$ клеток/мл и по 25 мкл клеточной суспензии распределяли в белые 96-луночные планшеты с плоским дном с разведениями bsTKP.

После загрузки пептида клетки T2 ресуспендировали и по 25 мкл распределяли в белые 96-луночные планшеты с плоским дном с разведениями bsTKP и клетками GloResponse™ NFAT-luc2 Jurkat до конечного соотношения эффекторов к мишеням 1:1 (по 75.000 клеток каждого вида). Планшеты в полностью собранном виде перемешивали на шейкере для планшетов в течение 5 минут при 300 об/мин и инкубировали в течение 18–20 ч при 37° С, 5% CO₂. После периода инкубации в каждую лунку добавляли 75 мкл реагента люциферазы Bio-Glo™ и планшеты инкубировали на шейкере для планшетов в течение минут при 300 об. мин в темноте до начала считывания показателей люминесценции при времени интеграции 0,5 секунд с помощью планшет-ридера Synergy2 (Biotek). Измеренную в относительных световых единицах люминесценцию (RLU) преобразовывали в кратность индукции для каждой лунки, деля измеренное значение RLU на значения контрольных планшетов.

9. Кристаллизация и визуализация

Комплекс Y84C/A139C HLA-A*02:01–SLLMWITQV и ТКР 1G4 концентрировали и смешивали в соотношении 1:1 до получения концентрации 7 мг/мл для кристаллизации. Эксперимент диффузии пара в варианте с «сидячей» каплей приводил к образованию кристаллов в присутствии маточного раствора, содержащего 0,1 М ацетата аммония, 0,1 М раствора Бис-Трис (pH 5,5), и 17% полиэтиленгликоля (ПЭГ) 10 000. Монокристалл переносили в раствор криопротектора, содержащий 0,1 М ацетата аммония, 0,1 М раствора Бис-Трис (pH 5,5), 20% (масс./об.) ПЭГ 10 000, и 10% глицерина. Кристалл был размещен и подвергнут криогенному охлаждению при 100 К с использованием Beamline P14 в EMBL P14, содержащем детектор EIGER 16M, в исследовательском центре «Немецкий Электронный Синхротрон». Был получен набор рентгенографических данных для разрешения 2,5 Å (Таблица 2).

Таблица 2 Собранные данные и статистика уточнения белка 1G4/ Y84C/A139C HLA-A*02:01/SLLMWITQV

	1G4/ Y84C/A139C HLA-A*02:01/SLLMWITQV
Собранные данные	
Пространственная группа	P2 ₁
Параметры решетки	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	75,44; 53,67; 121,74
α , β , γ (°)	90,0 98,0 90,0
Разрешение (Å)	2,50 (2,60–2,50) *

R_{rim}	0,037 (0,69)
$I / \sigma I$	9,6 (1,1)
CC (1/2)	100,0 (0,68)
Полнота (%)	99,3 (99,1)
Избыточность	4,8 (5,0)
Уточнение	
Разрешение (Å)	30 – 2,50
Число отражений	33552
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$	0,229 (0,273)
Число атомов	
Блок	3180
Лиганд/ион	19
Вода	589
<i>B</i> -факторы	
Блок	98,1
Лиганд/ион	97,8
Вода	66,2
Среднеквадратические отклонения	
Длина связей (Å)	0,002
Углы связей (°)	0,47

Обработка данных производилась с помощью программы XDS и изменение масштаба – с помощью программы AIMLESS (35, 36). Молекулярные замены производили с помощью программы MOLREP, используя координаты участка ТКР сначала природного комплекса, а затем – рМНС [Банк данных белков (Protein Data Bank (PDB)) 2BNR], и структуру уточняли, используя программу REFMAC5 (37, 38). Сконструированная дисульфидная связь была встроена вручную с помощью программы Coot (39). Структуру уточняли до *R*-фактора, составляющего 22,9% (R_{free} равен 27,3%). Систему MolProbity использовали для валидации геометрической структуры, и она показала, что 93,9% всех остатков находилось в разрешенных областях карты Рамачандрана [с одним остатком глицина (Gly143) в неразрешенных областях] (40).

10. Идентификация потенциально перекрестно реагирующих пептидных лигандов по мотиву

Поиски лигандов нонамерных пептидов, совпадающих с одной из потенциальных комбинаций, разрешенных мотивом для поиска, производили при использовании банка данных белков человека NCBI. Этот банк данных охватывает все избыточные трансляции CDS (кодирующей последовательности) банка данных GenBank, а также записи из PDB, SwissProt, PIR, и PRF, однако без включения природных образцов из проектов полногеномного секвенирования методом «дробовика». Банк данных использовали непосредственно с сервера NCBI.

11. Получение с помощью Seq2Logo

Логотипы Seq2Logos, визуализирующие связывающий мотив, были получены при использовании обратного значения измеренных показателей K_d для соответствующего взаимодействия и их деления на 10^8 . Эти значения были собраны в виде файла оценочной матрицы, специфической для положения замен, и обрабатывались с помощью модуля PSSM-Logo сетевого ресурса Seq2Logo Датского технического университета, отделения биоинформатики (27).

12. Связывание пептида, измеренное с помощью анизотропии флуоресценции

Связывание пептидов оценивали в анализе анизотропии флуоресценции на 300 нМ очищенных ренатурированных молекул Y84C/A139C HLA-A*02:01. 100 нМ высокоаффинного пептида NLVPK_{FITC}VATV (Genecast) с флуоресцентной меткой добавляли к свернутым молекулам Y84C/A139C HLA-A*02:01 и проводили кинетические измерения с помощью многорежимного считывателя планшетов Tecan Infinite M1000 PRO (Tecan, Крайльсхайм, Германия), измеряющего анизотропию (FITC λ_{ex} = 494 нм, λ_{em} = 517 нм). Y84C/A139C HLA-A*02:01 использовали либо непосредственно после рефолдинга или после хранения при -80° C в буфере хранения (10% глицерин, 50 mM Tris-HCL, pH 8,0) в течение указанного периода времени до проведения измерений. Кинетические измерения производили при комнатной температуре (22-24° C) в 50 mM буфере HEPES, pH 7,5. Данные наносили на график с помощью GraphPad Prism версии 7.

13. Анализ с помощью антител к бета-2 микроглобулину методом ELISA

Стрептавидин (Molecular Probes, кат. № S888) при конечной концентрации 2 мкг/мл в PBS добавляли в планшеты Nunc MAXIsorp (Thermo Fisher, кат. № 439454) и закрытые планшеты инкубировали в течение ночи при комнатной температуре во влажной среде. На следующий день планшеты промывали 4 раза промывочным буфером (PBS, 0,05% TWEEN-20) при использовании ELx405 промывателя планшетов ELx405 (Biotek). В каждую лунку добавляли 300 мкл блокирующего буфера (PBS с 2% BSA) и закрытые планшеты инкубировали при 37° C в течение 1 часа. Блокирующий буфер удаляли до внесения 100 мкл соответствующего препарата рМНС после обмена под воздействием УФ-излучения в разведении 1:100 в блокирующем буфере. Стандартные серии в диапазоне от 500 нг/мл до 15,6 нг/мл с ренатурированным по стандартным методикам мономером рМНС были

включены в каждый планшет. Краевые лунки заполняли 300 мкл блокирующего буфера, чтобы снизить воздействие краевых эффектов, и закрытые планшеты инкубировали при 37° С в течение 1 часа. Планшеты снова промывали 4 раза до внесения 100 мкл вторичного антитела к бета-2 микроглобулину, конъюгированного с пероксидазой хрена (Acris, кат. № R1065HRP), при конечной концентрации 1 мкг/мл в каждую лунку. Закрытые планшеты инкубировали при 37° С в течение 1 часа. Планшеты снова промывали 4 раза промывочным буфером до внесения 100 мкл субстрата TMB комнатной температуры (Sigma, кат. № T0440) в каждую лунку. Планшеты инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре до прекращения реакции добавлением 50 мкл 1N H₂SO₄ в каждую лунку. Планшеты сразу же анализировали, производя считывание поглощения при 450 нм в течение 5 секунд на планшет-ридере Synergy2. Концентрацию pMHC вычисляли на основании стандартной методики аппроксимации кривых ($\text{Log}(Y)=A*\text{Log}(X)+B$) при использовании программы Synergy2. Данные наносили на график с помощью GraphPad Prism версии 7.

14. Анализ связывания пептида с T2 методом проточной цитометрии

Клеточная линия T2 с дефицитом TAP, экспрессирующая HLA-A*02:01, была получена из ATCC (CRL-1992), и ее культивировали в среде RPMI Medium 1640 GlutaMAX™ (Thermo Fisher, кат. № 61870010) с добавлением 10% инактивированной нагреванием эмбриональной телячьей сыворотки (Life Technologies, кат. № 10270106) и антибиотиков пенициллина и стрептомицина (Bioszym, кат. № 882082, каждого по 100 мкг/мл) вплоть до числа пассажей 16, если это было необходимо. Клетки T2 собирали из перевиваемой культуры клеток, промывали и ресуспендировали в питательной среде T2 с концентрацией $3,3 \times 10^6$ клеток/мл и переносили в 96-луночные планшеты с круглым дном (Corning costar®, кат. № 3799). Пептид в DMSO, 0,5% TFA добавляли до конечной концентрации 10 мкМ и суспензию инкубировали в течение 2 часов при 37° С, 5% CO₂. Планшеты промывали дважды PFEA (PBS, 2% FCS, 2 мМ EDTA, 0,01% азида натрия) до внесения 50 мкл меченых ФЭ антител к HLA-A2 человека (Biolegend, кат. № 343305) в каждую лунку в разведении 1:250 с PFEA до конечной концентрации 0,8 мкг/мл. Планшеты инкубировали при 4° С в течение 30 минут перед двукратной промывкой PFEA. Наконец, клетки ресуспендировали в фиксирующем растворе (PFEA, 1% формальдегид) и хранили при 4° С до анализа при использовании платформы iQue Screener (Intellicyt). T2 клетки гейтировали на основании сигнала FSC-A/SSC-A, и

дублиеты удаляли при использовании исключения дублиетов FSC-H/FSC-A. Координаты гейта для выделения ФЭ-канал-положительной популяции были основаны на неокрашенном контроле. Данные наносили на график с помощью GraphPad Prism версии 7.

15. Выравнивание последовательностей

Выравнивания множества последовательностей производили с помощью алгоритма Clustal Omega Multiple Sequence Alignment (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) (Madeira *et al.* "The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019", *Nucleic Acids Research*, 47:W636-W641, 2019, doi: 10.1093/nar/gkz268).

16. Статистический анализ

Все данные наносили на график с помощью программы GraphPad Prism версии 7. Корреляцию наборов данных x и y рассчитывали с помощью вычисления коэффициента корреляции Пирсона и выводили в виде R^2 при использовании программы GraphPad Prism версии 7. Значения R^2 и χ^2 для подбора кривых измерений кинетики связывания с помощью биослойной интерферометрии рассчитывали при использовании программы DataAnalysis HT версии 10.0.3.7 системы Octet RED384.

17. Дизайн и получение дисульфид-стабилизированных пустых молекул HLA-A*02:01

Моделирование молекулярной динамики пустых и нагруженных пептидом молекул МНС I класса показали, что первые имеют повышенную подвижность в F-кармане, который вмещает C-конец пептидного лиганда (16). В предыдущих исследованиях введением в молекулу МНС I класса H-2K^b мыши дисульфидной связи между находящимися напротив друг друга остатков в F-кармане за счет мутации замены тирозина в положении 84 и аланина в положении 139 в цистеины было возможно стабилизировать этот комплекс. Эта мутантная молекула могла быть ренатурирована без пептида полной длины и была способна связываться с пептидом с обратной связью (17, 18).

Авторы изобретения предположили, что так же концепция может быть применима для молекулы МНС I класса человека HLA-A*02:01. Модификации, приводящие к

мутации тирозина в положении 84 и аланина в положении 139 в остатки цистеина, были введены в экспрессионную плазмиду тяжелой цепи HLA-A*02:01. После получения в виде телец включения в клетках *E. coli* тяжелую цепь инкубировали в полученном подобным образом β_2m , но без пептида в ренатурирующем буфере. После проведения эксклюзионной хроматографии (SEC) HLA-A*02:01-ассоциированной фракции мономера не наблюдалось в отличие от контроля дикого типа, осуществившего рефолдинг с 9-мерным пептидом.

Во втором подходе в реакцию ренатурации добавляли дипептид ГМ: Этот дипептид обладает очень низкой аффинностью по отношению к комплексу MHC I класса и способствует рефолдингу (19). Во время SEC он быстро диссоциирует из связывающего кармана при замене буфера на подвижный буфер, приводя к образованию очищенных пустых дисульфид-стабилизированных комплексов Y84C/A139C HLA-A*02:01. Пустые комплексы A*02:01 дикого типа (WT-A*02:01) не могли быть получены тем же способом. Комплексы WT-A*02:01 могут быть получены с дипептидом, но они разлагаются при попытке удаления дипептида с помощью замены буфера.

Авторы изобретения также ввели модификации в экспрессионную плазмиду тяжелой цепи HLA-A*02:01, приводящие к мутации замены фенилаланина в положении 22 и серина в положении 71 в цистеин. После получения в виде телец включения в клетках *E. coli* тяжелую цепь инкубировали с полученным подобным образом β_2m , но без пептида, в ренатурирующем буфере. После SEC на выходе были получены очищенные пустые дисульфид-стабилизированные комплексы F22C/S71C HLA-A*02:01. Авторы изобретения также ввели модификации в экспрессионную плазмиду тяжелой цепи HLA-A*02:01, приводящие к мутации фенилаланина в положении 22 и серина в положении 71, а также триптофана в положении 51 и глицина в положении 175 в цистеин. После получения в виде телец включения в клетках *E. coli* тяжелую цепь инкубировали с полученным подобным образом β_2m , но без пептида, в ренатурирующем буфере. После SEC на выходе были получены очищенные пустые дисульфид-стабилизированные комплексы F22C/S71C W51C/G175C HLA-A*02:01.

Отсутствие дипептида ГМ в очищенном мономере могло быть продемонстрировано в анализе температурной стабильности при помощи замены буфера: пустая

молекула Y84C/A139C HLA-A*02:01 обладала меньшей температурной стабильностью (т. е. имела более низкую температуру плавления), чем та же самая молекула в комплексе с дипептидом ГМ (41).

Полученные в результате молекулы были либо биотинилированы при 4° С в течение ночи и отделены от избытка биотина проведением второго цикла SEC, либо их непосредственно отправляли на хранение при -80° С до использования.

18. Загрузка пептидов и измерения аффинности с использованием растворимых ТКР и молекул МНС дикого типа или дисульфид-модифицированных молекул МНС

Затем авторы изобретения определили, могут ли дисульфид-модифицированные молекулы HLA-A*02:01 образовывать комплекс пептида и молекулы МНС и связываться с лигандами ТКР. Измерения аффинности производили с помощью биослойной интерферометрии (BLI) в системе OctetRED 384 с использованием денатурированных ТКР 1G4 в качестве растворимого анализата. Данный ТКР распознает HLA-A*02:01-специфический пептид SLLMWITQC (ESO 9C, SEQ ID NO: 3), полученный из раково-тестикулярного антигена NY-ESO-1 или его синтетический вариант SLLMWITQV (ESO 9V, SEQ ID NO: 4) (20,21). Биотинилированный Y84C/A139C HLA-A*02:01 либо иммобилизовали непосредственно в его пустом состоянии, либо после кратковременной инкубации с пептидом ESO 9V на покрытых стрептавидином биосенсорах (Фиг. 1b). Разницы замечено не было между инкубацией пептидов в течение 5 минут – это минимальное время, необходимое для инициации измерений аффинности после сборки, или более длительной инкубацией. Дальнейший анализ показал, что полный обмен действительно происходил в течение одной или двух минут, когда использовались высокие концентрации пептида. Кинетические показатели измеряли при многочисленных концентрациях 1G4, а HLA-A*02:01 дикого типа, непосредственно после рефолдинга с ESO 9V, служил в качестве контроля.

Связывание ТКР 1G4 с комплексом Y84C/A139C HLA-A*02:01 9V или WT-A*02:01 ESO 9V было очень похожим в отношении сенсограмм и уровней K_d , полученных подбором кривых (Фигура 2a и 2b). Слабый сигнал связывания (но отсутствие диссоциации) мог быть выявлен для пустого иммобилизованного мономера при высоких концентрациях 1G4 (Фигура 2c). Это связывание могло быть предотвращено за счет последующего добавления пептида, который не

распознается 1G4, такого как SLYNTVATL (Фигура 2d, SEQ ID NO: 5). Слабый сигнал, полученный с пустыми комплексами Y84C/A139C HLA-A*02:01, может быть объяснен неспецифическим взаимодействием ТКР с пустым карманом связывания, состоянием, с которым ТКР обычно не встречаются *in vivo*. Другие рестриктированные по A*02:01 растворимые ТКР с варьирующей специфичностью вели себя подобным образом, демонстрируя отсутствие связывания с нерелевантно нагруженными комплексами Y84C/A139C HLA-A*02:01 pMHC, но ассоциируясь с функционально пустыми молекулами, хотя и с относительно низкой ответной реакцией (Фигура 11).

19. Корреляция измерений аффинности между дисульфид-модифицированным HLA-A*02:01 и WT-A*02:01 для ТКР с созревшей аффинностью

Установив возможность использования молекулы Y84C/A139C HLA-A*02:01 в качестве эквивалента лиганда WT-A*02:01 для немодифицированных ТКР, авторы изобретения хотели расширить данный анализ на высокоаффинные ТКР с мутацией и большее количество пептидных лигандов. Авторами изобретения использовались созревшие одноцепочечные ТКР (scTv) 868Z11, вариант ТКР с созревшей аффинностью, который распознает образованный из ВИЧ p17 Gag, рестриктированный по HLA-A*02:01 пептид SLYNTVATL (SL9, SEQ ID NO: 5) (8, 22).

Авторы изобретения осуществляли измерения аффинности путем иммобилизации пустых или нагруженных пептидом SL9 дисульфид-модифицированных молекул HLA-A*02:01 на стрептавидиновом биосенсоре и измерения в сравнении с растворимым bs-868Z11-CD3, вариантом bsTKP, экспрессированным на домене 868Z11 scTv, в слитой форме с гуманизированным антителом к CD3 (Фигура 9)(23). Аффинность связывания для нагруженных пептидом SL9 дисульфид-модифицированных комплексов pMHC с HLA-A*02:01 при использовании либо Y84C/A139C HLA-A*02:01, F22C/S71C HLA-A*02:01, либо F22C/S71C W51C/G175C HLA-A*02:01, была схожей с SL9 WT-A*02:01 pMHC, полученных за счет обмена пептидными лигандами под воздействием УФ-излучения (25) и составила 2,35 нМ и 3,24 нМ, соответственно (Фиг. 3а и также Фиг. 14). Для данного bsTKP (Фиг. 3С) связывание не могло быть измерено в комплексе с пустыми молекулами MHC и с нерелевантно нагруженными комплексами Y84C/A139C HLA-A*02:01 при высокомолярных концентрациях в 13,3 мкМ.

Затем, авторы изобретения анализировали аффинности связывания bs-868Z11-CD3 по отношению к библиотеке с перебором всех возможных аминокислот в определенном положении пептида для оптимизации последовательности, основанной на последовательности пептида SL9. Данная библиотека была создана за счет замены одной аминокислоты в одном положении пептида дикого типа SL9 на 18 оставшихся протеиногенных аминокислот, при этом сохраняя все другие положения, с получением в результате 162 различных пептида, если это осуществлялось во всех положениях нонамера (цистеины были исключены из-за их тенденции к димеризации) (24). Комплексы pMHC были получены авторами изобретения либо за счет добавления к молекуле Y84C/A139C HLA-A*02:01, как раньше, либо путем проведения обмена пептидными лигандами под воздействием УФ-излучения – технологии, применяющейся для создания комплексов pMHC (25). Соответствующие комплексы pMHC были иммобилизованы на стрептавидине, и кинетику измеряли при двух различных концентрациях bs-868Z11-CD3. Как ожидалось, использование альтернированных пептидных лигандов, приводило к широкому спектру различных уровней K_d , находящихся в диапазоне от не поддающихся обнаружению в пределах границ чувствительности выбранной установки до сравнимых или даже более сильных, что касается взаимодействия, чем с немодифицированным пептидом SL9.

Для прямого сравнения: были выбраны все измеренные комплексы pMHC, которые давали поддающиеся оценке сигналы при обеих концентрациях аналита и аппроксимации кривой с показателями R^2 , составляющими не менее 0,9, являясь репрезентативными для сигналов в пределах выбранного диапазона чувствительности K_d . Показатели K_d для полученных в результате 140 пептидных лигандов были очень похожими во всем диапазоне аффинности при построении графика их зависимости друг от друга, факт, подтверждаемый высоким значением коэффициента корреляции (Фиг. 3d). Отклонения находились в пределах 2-кратного диапазона для более 90% пар pMHC и 6,82-кратные расхождения были наивысшим показателем. Внутри группы с более чем 2-кратными изменениями наблюдалась тенденция в сторону большей константы диссоциации для измерений с молекулой Y84C/A139C HLA-A*02:01.

Количество функциональных молекул pMHC, иммобилизованных на каждом биосенсоре, выраженное зарегистрированным значением R_{max} для 140 различных пептидных лигандов из библиотеки с перебором всех возможных аминокислот в

определенном положении пептида для оптимизации последовательности, было сравнимым для обоих видов, дикого типа и дисульфид-стабилизированных молекул рМНС (коэффициент корреляции $R^2 = 0,9459$).

На Фигуре 15 представлены значения K_d высокоаффинного ТКР по отношению к различным комплексам рМНС. В каждом случае уровень K_d молекул WT-A*02:01 или молекулы Y84C/A139C HLA-A*02:01 показан на оси X, а уровень K_d двух различных дисульфид-модифицированных молекул МНС HLA-A*02:01 показан на оси y, и каждая точка представляет собой один из различных пептидов, нагруженных на молекулу МНС. В каждом квадрате на Фигуре 15 представлены следующие пептиды: A: HIV-005 WT (SLYNTVATL, SEQ ID NO: 5)

- B: HIV-005 6I (SLYNTIATL, SEQ ID NO: 110)
- C: HIV-005 8V (SLYNTVAVL, SEQ ID NO: 145)
- D: HIV-005 3F (SLFNTVATL, SEQ ID NO: 59)
- E: HIV-005 3F6I8V (SLFNTIAVL), SEQ ID NO: 318)
- F: HIV-005 3F8V (SLFNTVAVL, SEQ ID NO: 319)
- G: HIV-005 3F6I (SLFNTIATL, SEQ ID NO: 320)
- H: HIV-005 6I8V (SLYNTIAVL, SEQ ID NO: 321)

В верхней левой секции представлен график зависимости уровня K_d для каждого указанного выше пептида комплекса WT-A*02:01 рМНС относительно уровня K_d дисульфид-модифицированного комплекса F22C/S71C HLA-A*02:01 рМНС. Дисульфид-модифицированный комплекс F22C/S71C HLA-A*02:01 рМНС демонстрирует практически идентичные уровни K_d с комплексом WT-A*02:01 рМНС для каждого из исследованных пептидов. В нижней левой секции представлен график зависимости уровня K_d для каждого указанного выше пептида комплекса WT-A*02:01 рМНС относительно уровня K_d дисульфид-модифицированного комплекса F22C/S71C W51C/G175C HLA-A*02:01 рМНС, который демонстрирует также практически идентичные уровни K_d в сравнении с комплексом WT-A*02:01 рМНС для каждого из исследованных пептидов.

В верхней правой секции представлен график зависимости уровня K_d для каждого указанного выше пептида комплекса Y84C/A139C HLA-A*02:01 рМНС относительно уровня K_d дисульфид-модифицированного комплекса F22C/S71C HLA-A*02:01

pMHC. В нижней правой секции представлен график зависимости уровня K_d для каждого указанного выше пептида комплекса Y84C/A139C HLA-A*02:01 pMHC относительно уровня K_d дисульфид-модифицированного комплекса F22C/S71C W51C/G175C HLA-A*02:01 pMHC. Дисульфид-модифицированные комплексы pMHC с F22C/S71C и с мутантом F22C/S71C W51C/G175C имеют практически идентичные уровни K_d в сравнении с комплексом Y84C/A139C HLA-A*02:01 pMHC для каждого из исследованных пептидов. Таким образом, можно заключить, что дисульфид-модифицированные молекулы HLA-A*02:01, нагруженные различными пептидами и образующие комплексы pMHC, распознаются соответствующими ТКР с созревшей аффинностью в сравнимой мере с комплексом pMHC WT HLA-A*02:01. Поэтому на функцию дисульфид-модифицированных молекул HLA-A*02:01, нагруженных пептидами (комплексы pMHC), не влияет внедрение стабилизирующих аминокислотных мутаций в молекулу HLA-A*02:01.

Результаты, представленные на Фигуре 15, для специалистов данной области являются достоверной информацией, что дисульфид-модифицированные молекулы HLA-A*02:01 в соответствии с настоящим изобретением, нагруженные пептидными лигандами и образующие дисульфид-модифицированные комплексы pMHC вызывают ответ Т-клеток при их связывании с соответствующим ТКР.

20. Высокопроизводительный кинетический скрининг на получение связывающего мотива

Быстрое и гибкое получение комплексов pMHC упрощает сбор масштабных наборов данных по аффинности связывания для многих различных pMHC. Одним примером такого набора данных является скрининг библиотеки с перебором всех возможных аминокислот в определенном положении пептида для оптимизации последовательности в целях получения связывающего мотива pMHC bsTKR, который может служить в качестве одного компонента в подходе по скринингу на безопасность bsTKR. Для осуществления таких измерений pMHC должны в идеальном случае использоваться в виде растворимого анализита, поскольку это предоставляет множество преимуществ. Во-первых, иммобилизация того же самого лиганда с известной активностью повторно, например, bsTKR, позволяет лучше интерпретировать результаты подбора, в особенности зарегистрированного уровня R_{max} . Во-вторых, использование комплексов pMHC в виде растворимых анализитов вместо иммобилизации является предпочтительным для быстрого и

экономичного высокопроизводительного скрининга, поскольку существует широкий спектр регенируемых биосенсоров, способных к обратимой иммобилизации биспецифических конструкций ТКР. Эти биосенсоры обычно покрыты антителами и могут быть использованы не менее 20 раз в кинетических измерениях без снижения качества считывания. В-третьих, иммобилизация bsТКР – это единственная опция, доступная для измерения моновалентной аффинности, когда bsТКР или антитело имеют несколько компонентов, связывающихся с рМНС, поскольку при использовании иммобилизованных рМНС может быть измерена только avidность.

Опосредованный УФ-излучением обмен пептидными лигандами может привести к образованию большого количества различных комплексов рМНС, однако эффективность обмена варьируется в зависимости от пептида и его аффинности связывания с соответствующим аллелем МНС I класса, что приводит к различным концентрациям рМНС в образцах (Фигура 10). Данная неопределенность представляет собой проблему для измерений аффинности с комплексами рМНС, использованными в виде растворимых аналитов, поскольку для точного определения уровней аффинности желательно точное знание концентрации. Поскольку дисульфид-стабилизированный мутантный Y84C/A139C HLA-A*02:01 является стабильным без какого-либо пептида, то это ограничение неприменимо. Если пептиды добавляют в высокой концентрации, достаточной для насыщения пустых комплексов МНС, эффективная концентрация комплексов рМНС становится известной, что существенно повышает точность измерений и позволяет избежать ложноотрицательных результатов. Примеры такого поведения могли быть обнаружены в библиотеке с перебором всех возможных аминокислот в определенном положении пептида для оптимизации последовательности, что приводило к плохо согласующимся данным и неправильным вычислениям аффинности, когда использовались препараты на основе УФ-обмена, в сравнении с загрузкой комплекса пептид Y84C/A139C HLA-A*02:01 (Фиг. 5, 6, 10) (26). Точное измерение аффинности bsТКР для таких пептидов может быть важным в контексте получения связывающего мотива, поскольку эти замены могут привести к получению подходящих компонентов, связывающих МНС, в случае комбинации с заменами в других положениях. Толерантность к аминокислотам со стороны bsТКР должна быть, таким образом, правильно отражена в универсальном связывающем мотиве.

За счет иммобилизации комплексов bsТКР bs-868Z11-CD3 авторам изобретения удалось проанализировать библиотеку с перебором всех возможных аминокислот в определенном положении пептида для оптимизации последовательности при четырех различных концентрациях растворимых рМНС для каждого пептидного лиганда в диапазоне от 500 до 15,8 нМ в течение 4 часового периода измерений без обслуживающего персонала, цена которого в 20 раз ниже. Все кривые, достигающие уровня сигнала не менее 0,05 нм, были включены в подбор, позволяя получить в результате универсальный связывающий ТКР мотив (Фигуры 4а, 8, Таблица 3).

Таблица 3: аффинность связывания bs-868Z11-CD3 для пептида SV9 SLYNTVATL (SEQ ID NO: 5) и пептидов из библиотеки с перебором всех возможных аминокислот в определенном положении пептида для оптимизации последовательности (SEQ ID NOS: 16–177). В таблицу включены значения K_D , k_{on} и k_{off} , определенные аппроксимацией кривых, следуя 1:1 модели связывания Лангмура, при использовании программы анализа данных Fortébio Data Analysis HT 10.0.3.7. Сообщается о соответствующей погрешности измерений, а также точность аппроксимации в соответствии с моделью. Пептиды, заявленные как «неподходящие», не имели поддающихся оценке кривых, достигающих по меньшей мере пика сигнала на уровне 0,05 нм при какой-либо концентрации.

Пептид	K_D (М)	Погрешность K_D	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	Погрешность k_{on}	k_{off} (s^{-1})	Погрешность k_{off}	χ^2 целиком	R^2 целиком
SLYNTVATL	3.81E-09	1.49E-10	1.03E+05	1.45E+02	3.91E-04	1.53E-05	0.262	0.9993
GLYNTVATL	3.05E-08	3.55E-10	1.04E+05	3.42E+02	3.19E-03	3.56E-05	1.0915	0.9966
PLYNTVATL	8.54E-09	3.46E-10	9.65E+04	3.03E+02	8.24E-04	3.33E-05	1.2363	0.9969
ALYNTVATL	5.82E-09	3.18E-10	1.04E+05	3.14E+02	6.04E-04	3.29E-05	1.2791	0.9969
VLYNTVATL	5.74E-09	2.24E-10	1.05E+05	2.27E+02	6.04E-04	2.35E-05	0.6719	0.9984
LLYNTVATL	4.99E-08	2.99E-10	1.04E+05	2.67E+02	5.17E-03	2.80E-05	0.5623	0.9981
ILYNTVATL	1.35E-08	2.35E-10	1.06E+05	2.40E+02	1.43E-03	2.47E-05	0.6748	0.9982
MLYNTVATL	4.19E-08	2.95E-10	1.09E+05	2.93E+02	4.56E-03	2.96E-05	0.6922	0.9978
FLYNTVATL	5.22E-08	3.07E-10	1.15E+05	3.20E+02	6.02E-03	3.13E-05	0.6452	0.9976
YLYNTVATL	1.24E-07	5.65E-10	1.15E+05	4.01E+02	1.43E-02	4.21E-05	0.4931	0.9972
WLYNTVATL	4.62E-07	4.57E-09	1.66E+05	1.48E+03	7.66E-02	3.27E-04	0.1216	0.9955
HLYNTVATL	3.43E-07	2.50E-09	1.34E+05	8.87E+02	4.60E-02	1.43E-04	0.1908	0.9961
KLYNTVATL	1.91E-08	2.14E-10	9.03E+04	1.67E+02	1.73E-03	1.91E-05	0.3239	0.999
RLYNTVATL	4.42E-09	5.15E-10	8.86E+04	3.93E+02	3.92E-04	4.56E-05	2.0699	0.9944
QLYNTVATL	1.38E-07	5.55E-10	9.85E+04	3.05E+02	1.36E-02	3.50E-05	0.3534	0.9981
NLYNTVATL	3.13E-08	3.42E-10	9.84E+04	2.98E+02	3.08E-03	3.23E-05	0.9466	0.9973
ELYNTVATL	4.85E-07	4.84E-09	9.29E+04	8.66E+02	4.50E-02	1.63E-04	0.4525	0.9948

DLYNTVATL	4.49E-08	3.46E-10	9.55E+04	2.77E+02	4.28E-03	3.06E-05	0.7816	0.9977
TLYNTVATL	6.94E-09	2.07E-10	1.02E+05	1.98E+02	7.07E-04	2.10E-05	0.544	0.9988
SGYNTVATL	1.86E-08	4.56E-10	8.40E+04	3.18E+02	1.56E-03	3.79E-05	1.3876	0.9964
SPYNTVATL	1.65E-07	2.27E-09	6.80E+04	7.29E+02	1.12E-02	9.66E-05	2.2025	0.9852
SAYNTVATL	1.00E-08	1.28E-10	1.02E+05	1.23E+02	1.02E-03	1.30E-05	0.2052	0.9995
SVYNTVATL	8.47E-09	1.64E-10	1.01E+05	1.55E+02	8.57E-04	1.65E-05	0.3327	0.9992
SIYNTVATL	8.68E-09	9.77E-11	1.02E+05	9.42E+01	8.89E-04	9.97E-06	0.1192	0.9997
SMYNTVATL	6.55E-09	2.07E-10	1.01E+05	1.95E+02	6.61E-04	2.08E-05	0.4808	0.9987
SFYNTVATL	8.52E-09	3.97E-10	9.54E+04	3.41E+02	8.13E-04	3.77E-05	1.5251	0.996
SYYNTVATL	3.26E-08	3.90E-10	5.83E+04	1.62E+02	1.90E-03	2.21E-05	0.23	0.9989
SWYNTVATL	8.16E-08	1.74E-09	4.46E+04	4.66E+02	3.64E-03	6.77E-05	0.9827	0.991
SHYNTVATL	2.73E-08	8.86E-10	6.92E+04	4.66E+02	1.89E-03	5.99E-05	2.1947	0.9915
SKYNTVATL	7.43E-08	1.57E-09	5.08E+04	5.00E+02	3.77E-03	7.06E-05	2.0162	0.9899
SRYNTVATL	1.02E-07	2.33E-09	4.84E+04	6.42E+02	4.95E-03	9.17E-05	0.6946	0.9837
SQYNTVATL	9.41E-09	2.19E-10	1.09E+05	2.35E+02	1.03E-03	2.37E-05	0.6976	0.9984
SNYNTVATL	2.45E-08	6.68E-10	6.85E+04	3.45E+02	1.68E-03	4.50E-05	1.7367	0.9953
SEYNTVATL	4.09E-08	1.77E-09	5.16E+04	6.23E+02	2.11E-03	8.78E-05	4.5691	0.9843
SDYNTVATL	1.01E-07	1.68E-09	6.51E+04	6.61E+02	6.56E-03	8.69E-05	3.2507	0.9854
SSYNTVATL	8.17E-09	1.97E-10	9.64E+04	1.72E+02	7.88E-04	1.89E-05	0.4063	0.999
STYNTVATL	5.41E-09	1.49E-10	9.87E+04	1.35E+02	5.34E-04	1.47E-05	0.2427	0.9994
SLGNTVATL	Неподходящие							
SLPNTVATL	Неподходящие							
SLANTVATL	Неподходящие							
SLVNTVATL	5.11E-07	5.80E-09	1.95E+05	2.01E+03	9.96E-02	4.80E-04	0.0769	0.9966
SLLNTVATL	1.32E-07	8.45E-10	1.21E+05	6.09E+02	1.60E-02	6.33E-05	1.038	0.9944
SLINTVATL	4.77E-07	5.50E-09	1.40E+05	1.48E+03	6.69E-02	3.15E-04	0.325	0.9939
SLMNTVATL	1.07E-06	5.52E-08	2.35E+05	1.12E+04	2.50E-01	5.13E-03	0.1244	0.979
SLFNTVATL	3.47E-08	1.92E-10	9.54E+04	1.59E+02	3.31E-03	1.75E-05	0.2445	0.9992
SLWNTVATL	3.36E-08	1.91E-10	9.34E+04	1.53E+02	3.14E-03	1.71E-05	0.2479	0.9992
SLHNTVATL	9.09E-08	3.31E-10	1.16E+05	2.84E+02	1.06E-02	2.85E-05	0.3676	0.9984
SLKNTVATL	Неподходящие							
SLRNTVATL	5.55E-07	5.54E-09	9.64E+04	9.00E+02	5.35E-02	1.88E-04	0.1675	0.9957
SLQNTVATL	6.29E-07	9.45E-09	2.62E+05	3.51E+03	1.65E-01	1.11E-03	0.0384	0.9961
SLNNTVATL	4.74E-07	5.90E-09	1.81E+05	2.05E+03	8.59E-02	4.48E-04	0.1049	0.9953
SLENTVATL	Неподходящие							
SLDNTVATL	Неподходящие							
SLSNTVATL	Неподходящие							
SLTNTVATL	3.01E-06	3.45E-06	1.88E+05	2.15E+05	5.66E-01	6.50E-02	0.1123	0.9199
SLYGTVATL	5.33E-07	1.20E-08	2.07E+05	4.15E+03	1.11E-01	1.12E-03	0.5678	0.9842
SLYPTVATL	5.54E-07	1.44E-08	3.62E+05	8.18E+03	2.00E-01	2.58E-03	0.0884	0.9892
SLYATVATL	1.15E-07	6.46E-10	1.40E+05	6.09E+02	1.60E-02	5.72E-05	0.9354	0.9952
SLYVTVATL	1.80E-07	9.65E-10	1.31E+05	5.98E+02	2.35E-02	6.64E-05	0.4669	0.9962
SLYLTVATL	6.70E-08	3.12E-10	1.11E+05	2.85E+02	7.44E-03	2.89E-05	0.5152	0.9981
SLYITVATL	5.25E-07	5.68E-09	1.18E+05	1.18E+03	6.19E-02	2.55E-04	0.2208	0.9949
SLYMTVATL	1.88E-06	2.10E-06	3.58E+05	3.96E+05	6.72E-01	1.11E-01	0.09	0.876
SLYFTVATL	Неподходящие							

SLYYTVATL	Неподходящие							
SLYWTVATL	Неподходящие							
SLYHTVATL	8.11E-08	6.16E-10	1.38E+05	7.03E+02	1.12E-02	6.26E-05	1.8422	0.9923
SLYKTVATL	Неподходящие							
SLYRTVATL	Неподходящие							
SLYQTVATL	2.84E-07	3.23E-09	1.71E+05	1.73E+03	4.86E-02	2.53E-04	0.6721	0.9898
SLYETVATL	Неподходящие							
SLYDTVATL	Неподходящие							
SLYSTVATL	5.95E-08	2.69E-10	1.27E+05	3.13E+02	7.57E-03	2.87E-05	0.5404	0.9981
SLYTTVATL	1.61E-07	7.59E-10	1.35E+05	5.34E+02	2.18E-02	5.63E-05	0.3965	0.9968
SLYNGVATL	6.03E-07	1.50E-07	5.42E+05	1.29E+05	3.27E-01	2.34E-02	0.0452	0.9399
SLYNPVATL	Неподходящие							
SLYNAVATL	9.66E-08	5.82E-10	1.27E+05	5.41E+02	1.22E-02	5.20E-05	0.9944	0.995
SLYNVVATL	3.07E-08	4.63E-10	9.09E+04	3.58E+02	2.79E-03	4.06E-05	1.3333	0.9958
SLYNLVATL	1.46E-08	3.05E-10	9.80E+04	2.73E+02	1.43E-03	2.97E-05	0.917	0.9976
SLYNIVATL	4.85E-08	3.37E-10	8.41E+04	2.21E+02	4.08E-03	2.62E-05	0.4314	0.9984
SLYNMVATL	4.26E-08	3.52E-10	1.20E+05	4.09E+02	5.12E-03	3.86E-05	1.2415	0.9962
SLYNFVATL	7.26E-07	3.75E-08	2.97E+05	1.36E+04	2.16E-01	5.09E-03	0.3346	0.9697
SLYNYVATL	4.60E-06	9.88E-06	1.37E+05	2.94E+05	6.31E-01	9.34E-02	0.1113	0.8904
SLYNWVATL	Неподходящие							
SLYNHVATL	6.23E-07	4.07E-08	4.00E+05	2.26E+04	2.49E-01	8.17E-03	0.2106	0.9526
SLYNKVATL	2.24E-07	1.05E-09	1.35E+05	5.55E+02	3.02E-02	6.82E-05	0.2572	0.9973
SLYNRVATL	7.78E-07	7.24E-08	3.54E+05	3.19E+04	2.76E-01	6.54E-03	0.02	0.9899
SLYNQVATL	4.72E-07	7.25E-09	2.10E+05	2.90E+03	9.91E-02	6.64E-04	0.131	0.9936
SLYNNVATL	1.19E-07	5.68E-10	1.32E+05	4.88E+02	1.58E-02	4.76E-05	0.5956	0.9966
SLYNEVATL	Неподходящие							
SLYNDVATL	3.91E-05	5.33E-04	1.23E+04	1.67E+05	4.79E-01	5.67E-02	0.1685	0.904
SLYNSVATL	6.91E-08	3.75E-10	1.21E+05	3.86E+02	8.39E-03	3.68E-05	0.7181	0.997
SLYNTGATL	1.34E-07	6.48E-10	1.37E+05	5.33E+02	1.84E-02	5.26E-05	0.5267	0.9965
SLYNTPATL	1.54E-08	1.56E-10	1.19E+05	1.93E+02	1.83E-03	1.82E-05	0.3561	0.999
SLYNTAATL	5.48E-08	3.74E-10	1.10E+05	3.59E+02	6.05E-03	3.62E-05	0.8843	0.9967
SLYNTLATL	9.08E-09	1.01E-10	1.12E+05	1.15E+02	1.02E-03	1.13E-05	0.15	0.9996
SLYNTIATL	8.74E-09	1.86E-10	9.97E+04	1.72E+02	8.71E-04	1.85E-05	0.3788	0.999
SLYNTMATL	2.72E-08	3.66E-10	9.75E+04	3.17E+02	2.65E-03	3.46E-05	0.9551	0.9966
SLYNTFATL	5.79E-07	6.47E-09	7.96E+04	8.39E+02	4.61E-02	1.69E-04	0.1416	0.9946
SLYNTYATL	4.43E-07	8.76E-09	4.61E+04	8.61E+02	2.04E-02	1.33E-04	0.1286	0.9831
SLYNTWATL	1.74E-05	1.28E-05	1.91E+03	1.41E+03	3.33E-02	2.40E-04	0.0063	0.9878
SLYNTHATL	1.75E-07	1.46E-09	7.39E+04	4.94E+02	1.30E-02	6.42E-05	0.3653	0.9929
SLYNTKATL	Неподходящие							
SLYNTRATL	Неподходящие							
SLYNTQATL	2.71E-07	1.50E-09	1.19E+05	5.86E+02	3.22E-02	7.94E-05	0.1392	0.9969
SLYNTNATL	1.79E-07	7.80E-10	1.20E+05	4.42E+02	2.15E-02	5.03E-05	0.2983	0.9974
SLYNTEATL	1.43E-06	5.11E-08	5.54E+04	1.93E+03	7.94E-02	5.83E-04	0.0772	0.99
SLYNTDATL	6.04E-07	7.08E-09	1.12E+05	1.22E+03	6.77E-02	2.89E-04	0.1139	0.995
SLYNTSATL	1.66E-07	6.43E-10	1.43E+05	4.69E+02	2.38E-02	4.93E-05	0.2673	0.9979
SLYNTTATL	3.37E-08	4.58E-10	1.07E+05	4.51E+02	3.59E-03	4.64E-05	1.7673	0.9938

SLYNTVGTL	8.29E-09	4.59E-10	8.24E+04	3.12E+02	6.83E-04	3.77E-05	1.2283	0.996
SLYNTVPTL	3.71E-09	4.42E-10	1.22E+05	5.76E+02	4.51E-04	5.36E-05	4.052	0.9904
SLYNTVVTL	5.99E-07	1.07E-08	1.44E+05	2.37E+03	8.64E-02	6.15E-04	0.1883	0.9892
SLYNTVLTL	Неподходящие							
SLYNTVITL	Неподходящие							
SLYNTVMTL	1.02E-07	4.28E-10	6.90E+04	1.80E+02	7.04E-03	2.31E-05	0.1333	0.9988
SLYNTVFTL	5.14E-07	1.01E-08	1.72E+05	3.07E+03	8.85E-02	7.06E-04	0.1274	0.9897
SLYNTVYTL	Неподходящие							
SLYNTVWTL	Неподходящие							
SLYNTVHTL	1.14E-07	2.51E-10	8.42E+04	1.27E+02	9.63E-03	1.53E-05	0.0763	0.9995
SLYNTVKTL	1.20E-06	5.58E-08	5.35E+04	2.43E+03	6.42E-02	6.41E-04	0.0792	0.9775
SLYNTVRTL	1.28E-06	2.41E-08	2.49E+04	4.61E+02	3.20E-02	9.10E-05	0.0547	0.9967
SLYNTVQTL	5.38E-08	7.00E-10	6.84E+04	3.40E+02	3.68E-03	4.43E-05	0.9296	0.9952
SLYNTVN TL	4.11E-08	8.02E-10	7.22E+04	4.32E+02	2.97E-03	5.51E-05	1.5878	0.9921
SLYNTVETL	1.61E-06	2.46E-07	5.74E+03	8.80E+02	9.22E-03	1.00E-04	0.007	0.989
SLYNTVDTL	Неподходящие							
SLYNTVSTL	1.04E-08	4.47E-10	9.80E+04	4.00E+02	1.02E-03	4.36E-05	1.9634	0.9944
SLYNTVTTL	6.90E-08	2.99E-10	9.23E+04	2.09E+02	6.37E-03	2.36E-05	0.2893	0.9987
SLYNTVAGL	1.14E-08	1.42E-10	1.14E+05	1.65E+02	1.30E-03	1.61E-05	0.302	0.9992
SLYNTVAPL	2.34E-07	1.20E-09	1.35E+05	6.11E+02	3.16E-02	7.71E-05	0.3155	0.9969
SLYNTVAAL	8.50E-09	1.51E-10	1.14E+05	1.75E+02	9.69E-04	1.72E-05	0.3504	0.9991
SLYNTVAVL	6.98E-09	1.19E-10	1.05E+05	1.20E+02	7.31E-04	1.25E-05	0.1881	0.9995
SLYNTVALL	1.58E-08	1.20E-10	9.58E+04	1.03E+02	1.51E-03	1.14E-05	0.1259	0.9996
SLYNTVAIL	4.16E-09	7.48E-10	9.74E+04	6.62E+02	4.05E-04	7.28E-05	5.8607	0.9834
SLYNTVAML	7.69E-09	5.22E-10	9.75E+04	4.63E+02	7.50E-04	5.08E-05	2.7181	0.9922
SLYNTVAFL	1.93E-07	1.68E-09	9.29E+04	6.77E+02	1.80E-02	8.45E-05	0.9456	0.9906
SLYNTVAYL	4.00E-07	3.75E-09	9.61E+04	8.32E+02	3.85E-02	1.39E-04	0.2451	0.994
SLYNTVAWL	2.09E-07	1.94E-09	9.65E+04	7.69E+02	2.01E-02	9.70E-05	1.0358	0.9893
SLYNTVAHL	1.09E-08	5.55E-10	9.19E+04	4.47E+02	1.00E-03	5.07E-05	2.6388	0.9925
SLYNTVAKL	1.73E-08	2.87E-10	1.02E+05	2.76E+02	1.77E-03	2.90E-05	0.9054	0.9975
SLYNTVARL	7.93E-09	3.98E-10	1.06E+05	4.06E+02	8.37E-04	4.19E-05	2.1201	0.9946
SLYNTVAQL	1.59E-08	6.14E-10	1.01E+05	5.74E+02	1.61E-03	6.13E-05	4.0059	0.9888
SLYNTVANL	1.08E-08	6.43E-10	1.01E+05	6.03E+02	1.09E-03	6.46E-05	4.5943	0.9874
SLYNTVAEL	4.73E-08	2.37E-10	9.22E+04	1.79E+02	4.36E-03	2.02E-05	0.291	0.999
SLYNTVADL	2.12E-08	3.17E-10	8.90E+04	2.40E+02	1.88E-03	2.77E-05	0.6889	0.9979
SLYNTVASL	4.68E-09	2.55E-10	1.09E+05	2.71E+02	5.08E-04	2.76E-05	0.918	0.9977
SLYNTVATG	7.71E-09	4.30E-10	1.01E+05	4.05E+02	7.79E-04	4.34E-05	2.1199	0.9943
SLYNTVATP	5.03E-08	1.57E-09	3.41E+04	3.34E+02	1.72E-03	5.08E-05	0.6961	0.9945
SLYNTVATA	6.74E-09	4.88E-10	1.13E+05	5.56E+02	7.61E-04	5.49E-05	3.6905	0.9904
SLYNTVATV	8.41E-09	6.00E-10	1.04E+05	5.95E+02	8.76E-04	6.23E-05	4.752	0.988
SLYNTVATI	6.70E-09	2.87E-10	1.13E+05	3.25E+02	7.53E-04	3.22E-05	1.2712	0.9968
SLYNTVATM	7.45E-09	2.48E-10	9.88E+04	2.26E+02	7.36E-04	2.44E-05	0.6922	0.9982
SLYNTVATF	1.19E-08	2.46E-10	7.18E+04	1.37E+02	8.51E-04	1.76E-05	0.2228	0.9992
SLYNTVATY	1.02E-08	3.37E-10	7.11E+04	1.85E+02	7.24E-04	2.39E-05	0.4625	0.9985
SLYNTVATW	3.32E-08	5.59E-10	3.70E+04	1.34E+02	1.23E-03	2.02E-05	0.0824	0.9991
SLYNTVATH	1.37E-08	3.64E-10	4.75E+04	1.19E+02	6.51E-04	1.72E-05	0.089	0.9993

SLYNTVATK	4.57E-08	1.20E-09	2.70E+04	2.00E+02	1.23E-03	3.11E-05	0.0929	0.9982
SLYNTVATR	5.71E-09	2.30E-10	9.59E+04	1.99E+02	5.48E-04	2.20E-05	0.5532	0.9986
SLYNTVATQ	5.88E-09	3.12E-10	8.96E+04	2.41E+02	5.27E-04	2.79E-05	0.7397	0.9978
SLYNTVATN	9.10E-09	3.77E-10	9.76E+04	3.36E+02	8.88E-04	3.67E-05	1.5971	0.9961
SLYNTVATE	6.96E-06	9.43E-06	3.79E+02	5.13E+02	2.64E-03	8.02E-05	0.1997	0.9908
SLYNTVATD	7.18E-06	8.48E-06	3.95E+02	4.67E+02	2.83E-03	7.30E-05	0.1137	0.9924
SLYNTVATS	7.19E-09	2.13E-10	1.16E+05	2.54E+02	8.33E-04	2.46E-05	0.7637	0.9981
SLYNTVATT	5.66E-09	1.27E-10	1.12E+05	1.42E+02	6.32E-04	1.41E-05	0.2627	0.9994

Таблица 4 Мотив для поиска перекрестно реагирующих пептидных лигандов для bs-868Z11-CD3 на основании уровней аффинности, измеренных с помощью библиотеки с перебором всех возможных аминокислот в определенном положении пептида для оптимизации последовательности. Все аминокислоты из 19 протеиногенных аминокислот, исследованные в каждом положении, которые вызывали рост соответствующей аффинности bsTKP выше 50 нМ, были удалены, чтобы достичь мотива для поиска.

Положение пептида	Разрешенные аминокислоты
1	GPAVLIMKRNDST
2	GAVLIMFYHQNEST
3	FYW
4	N
5	VLIMT
6	PVLIMT
7	GPANS
8	GAVLIMHKRQNEDST
9	GAVLIMFYWHKRQNST

Растворимые препараты Y84C/A139C HLA-A*02:01 pMHC могут храниться в течение не менее 2 недель при 4° С без снижения качества и использоваться в многочисленных анализах (Фигура 12; День 1: $K_D = 1,35E^{-09}$ М, $R^2 = 0,9992$; День 14: $K_D = 1,08E^{-09}$ М, $R^2 = 0,9991$).

TKP 868Z11 продемонстрировал ожидаемую картину распознавания: замены аминокислот в положениях 3–7 оказывали наибольшее воздействие на аффинность связывания с bsTCR. Интересно отметить, что только одна аминокислотная замена привела к увеличению аффинности связывания в случае bs-868Z11-CD3 по сравнению с взаимодействием с пептидом дикого типа, давая наглядную картину о том, какой исключительной аффинностью обладает этот TKP

по отношению к мишени в состоянии с созревшей аффинностью. Данное поведение можно также проиллюстрировать графически, если визуализировать связывающий мотив как график Seq2Logo (Фигура 4b) (27).

21. Идентификация пептидных лигандов, перекрестно реагирующих с bs-868Z11-CD3

Авторы изобретения, кроме того, желали изучить возможность использования полученного связывающего мотива для идентификации перекрестно реагирующих пептидных лигандов из человеческого генома. Авторы изобретения создали мотив для поиска пептидных лигандов из набора данных по аффинности, установив контрольное пороговое значение K_d на уровне 50 нМ: все одиночные аминокислотные замены, вызывающие рост уровня K_d для bs-868Z11-CD3 выше данного порогового значения, были исключены из мотива (Таблица 4). Основываясь на этом мотиве, авторы изобретения провели поиск в банке данных неизбыточных белковых последовательностей человека NCBI последовательностей нонамеров, которые совпадают с комбинациями, допускаемыми этим мотивом. В ходе поиска в пределах человеческого генома было идентифицировано свыше 400 совпадений, идентичных последовательности дикого типа SLYNTVATL, охватывая от 1 до 6 идентичных положений. Было отобрано 140 пептидов, образцы которых являются репрезентативными для распределения идентичности последовательности в более крупной группе, которая была синтезирована и использовалась для измерения аффинности (Таблица 5; SEQ ID NO: 178–317). Авторам изобретения удалось выявить аффинности связывания K_d в виде однозначного числа мкМ или выше для 91 из этих пептидов.

Таблица 5: аффинность связывания bs-868Z11-CD3 для выбранных пептидных лигандов, идентифицированных на основании мотива связывания bs-868Z11-CD3. Данные о последовательностях пептида и ассоциированных генах приведены в соответствии с банком данных NCBI, и пептиды отсортированы по убыванию уровня K_d . В таблицу включены значения K_D , k_{on} и k_{off} , определенные аппроксимацией кривых, следуя 1:1 модели связывания Лангмюра, при использовании программы анализа данных Fortébio Data Analysis HT 10.0.3.7. Сообщается о соответствующей погрешности измерений, а также точность аппроксимации в соответствии с моделью. Пептиды, заявленные как

«неподходящие», не имели поддающихся оценке кривых, достигающих по меньшей мере пика сигнала на уровне 0,05 нм при какой-либо концентрации.

Пептид	Ассоциированный ген	KD (M)	Погрешность KD	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	Погрешность k_{on}	k_{off} (s^{-1})	Погрешность k_{off}	χ^2 целиком	R^2 целиком
RVYNTVPLV	HIPK3	1.32E-08	1.76E-10	9.50E+04	1.69E+02	1.26E-03	1.66E-05	0.2908	0.9993
RMYNLVSRI	CUL1	1.91E-08	2.52E-10	9.25E+04	2.28E+02	1.76E-03	2.29E-05	0.5429	0.9986
SLYNMVPSI	OVOS	1.97E-08	1.71E-10	1.31E+05	2.89E+02	2.57E-03	2.16E-05	0.586	0.9987
TVYNMVPSI	OVOS	2.07E-08	1.54E-10	1.28E+05	2.50E+02	2.66E-03	1.91E-05	0.4228	0.999
ALYNVIAMA	SECISBP2L	2.11E-08	1.51E-10	9.28E+04	2.25E+02	1.96E-03	1.32E-05	0.114	0.9997
AIYNLLPDI	NCAPD2	2.33E-08	1.82E-10	1.01E+05	1.90E+02	2.36E-03	1.79E-05	0.3299	0.9992
STYNLVSTS	KIAA2018	2.47E-08	2.16E-10	7.07E+04	1.28E+02	1.75E-03	1.49E-05	0.1772	0.9995
SVYNMVPSI	OVOS2	2.68E-08	1.96E-10	1.32E+05	3.26E+02	3.53E-03	2.43E-05	0.6471	0.9984
RTYNVLAIL	ATP8B1	3.11E-08	1.55E-10	7.54E+04	9.93E+01	2.34E-03	1.12E-05	0.0937	0.9997
SVYNLVSA	KPTN	3.65E-08	2.01E-10	7.97E+04	2.13E+02	2.91E-03	1.40E-05	0.0926	0.9997
RAYNLIGTV	LOC100128501	3.72E-08	1.71E-10	8.94E+04	1.40E+02	3.33E-03	1.43E-05	0.1721	0.9995
ALFNLIPVG	FGF12	3.83E-08	3.22E-10	6.64E+04	1.71E+02	2.54E-03	2.04E-05	0.266	0.999
RIYNVIGTL	FOLH1,FOLH1B	4.53E-08	3.00E-10	5.75E+04	1.28E+02	2.61E-03	1.62E-05	0.1095	0.9994
RIYNVVGTI	NAALAD2	5.15E-08	4.13E-10	5.94E+04	1.81E+02	3.06E-03	2.27E-05	0.2723	0.9989
TLFNLVPNS	CLASP2	5.40E-08	3.31E-10	9.76E+04	2.90E+02	5.28E-03	2.82E-05	0.4822	0.9981
SLFNVISIL	KCNK12,KCNK13	5.83E-08	3.11E-10	6.94E+04	1.64E+02	4.05E-03	1.94E-05	0.2068	0.9992
STFNLVAIS	CCKAR	6.06E-08	2.91E-10	4.96E+04	9.98E+01	3.01E-03	1.31E-05	0.0436	0.9996
TLFNLIPVG	FGF12,FGF13,FGF14	6.32E-08	3.97E-10	6.72E+04	1.98E+02	4.25E-03	2.36E-05	0.3044	0.9988
TIFNLIPNS	CLASP1	6.41E-08	2.67E-10	8.97E+04	1.99E+02	5.75E-03	2.03E-05	0.2655	0.999
ALYNVLAKV	IFFO1,IFFO2	6.59E-08	2.96E-10	1.02E+05	2.63E+02	6.75E-03	2.49E-05	0.3602	0.9986
AVFNLLPHT	SMYD4	7.11E-08	2.72E-10	8.53E+04	1.82E+02	6.07E-03	1.93E-05	0.2344	0.9991
RMYNLLGHM	ZNF710	8.71E-08	7.55E-10	5.30E+04	2.55E+02	4.62E-03	3.33E-05	0.2278	0.9977
STWNTPPNM	KIAA0922	8.98E-08	3.45E-10	9.05E+04	2.28E+02	8.13E-03	2.36E-05	0.2591	0.9989
NIYNLIAII	BICD2	9.32E-08	3.91E-10	1.06E+05	3.10E+02	9.84E-03	2.95E-05	0.3894	0.9983
RIYNLPPEL	WRAP53	9.95E-08	3.78E-10	9.47E+04	2.51E+02	9.42E-03	2.56E-05	0.3026	0.9988
TTFNLPSAA	WDR17	1.02E-07	6.71E-10	7.87E+04	3.47E+02	8.04E-03	3.91E-05	0.579	0.997
MFFNVIAIV	UGGT2	1.06E-07	1.29E-09	5.21E+04	3.95E+02	5.52E-03	5.23E-05	0.0772	0.9934
SLWNTVSGI	HHLA1	1.08E-07	5.04E-10	8.88E+04	2.94E+02	9.60E-03	3.14E-05	0.3873	0.9982
MLWNLLALR	COX7A2	1.17E-07	1.03E-08	1.26E+06	1.05E+05	1.47E-01	4.25E-03	0.0448	0.9675
VFWNLLPTV	C12orf74	1.20E-07	7.20E-10	1.24E+05	5.97E+02	1.49E-02	5.29E-05	0.9116	0.9955
STFNTTSNG	QSER1	1.52E-07	6.60E-09	1.76E+05	7.05E+03	2.67E-02	4.39E-04	0.0311	0.9225
GFFNLLSHV	PCP2	1.59E-07	9.88E-09	6.24E+05	3.64E+04	9.94E-02	2.08E-03	0.0321	0.9717
LLYNVPAVA	APP	1.67E-07	1.27E-08	7.41E+05	5.29E+04	1.24E-01	3.21E-03	0.0164	0.9712

ALFNTISQG	VTA1	1.83E-07	8.26E-10	7.15E+04	2.68E+02	1.31E-02	3.28E-05	0.2214	0.9984
TTFNTLAGS	MUC16	1.97E-07	8.70E-10	9.03E+04	3.44E+02	1.78E-02	3.98E-05	0.1556	0.9981
SLWNLLGNA	LMAN2L	2.14E-07	3.02E-08	1.02E+06	1.35E+05	2.19E-01	1.07E-02	0.0324	0.952
SLYNLLNLT	SLC4A5	2.19E-07	8.40E-10	6.75E+04	2.24E+02	1.48E-02	2.85E-05	0.094	0.9988
GVWNLLSIV	ZSWIM8	2.52E-07	4.59E-08	1.09E+06	1.86E+05	2.74E-01	1.73E-02	0.0545	0.9403
ALFNVVNSI	SLC38A11	2.55E-07	2.10E-09	6.83E+04	4.99E+02	1.74E-02	6.59E-05	0.2897	0.9956
VIYNLLGLA	SH3TC2	2.64E-07	1.88E-09	1.07E+05	7.25E+02	2.83E-02	5.92E-05	0.2115	0.9983
SIFNIVAIA	GPR50	2.84E-07	1.60E-09	4.44E+04	2.37E+02	1.26E-02	2.25E-05	0.0369	0.9995
TVYNTVSEG	SLC39A6	3.04E-07	2.50E-09	4.71E+04	3.50E+02	1.43E-02	4.99E-05	0.2538	0.997
DLWNTLSSL	EFCAB13,ITGB3	3.39E-07	2.60E-08	4.15E+05	3.02E+04	1.41E-01	3.55E-03	0.0238	0.9752
IFFNLLAVL	POMT1	3.50E-07	4.75E-08	8.47E+05	1.08E+05	2.97E-01	1.35E-02	0.023	0.9688
DLFNLLPDV	PSMD7	3.60E-07	1.08E-08	7.69E+04	2.15E+03	2.77E-02	3.14E-04	0.0881	0.9367
LSWNVVPNA	SPCS3	3.67E-07	2.91E-08	4.13E+05	3.09E+04	1.52E-01	3.89E-03	0.0234	0.9734
MLWNLLALH	COX7A2P2	3.67E-07	2.04E-08	1.07E+06	4.75E+04	3.94E-01	1.33E-02	0.1159	0.9595
TIFNTVNTS	TIMMDC1	3.87E-07	2.77E-09	4.20E+04	2.80E+02	1.63E-02	4.19E-05	0.0304	0.9978
KTFNLIPAV	MRPL4	4.13E-07	2.59E-09	1.12E+05	6.52E+02	4.62E-02	1.07E-04	0.1185	0.9979
NLFNVTPLI	ZNF66P	4.28E-07	1.38E-07	1.05E+06	3.19E+05	4.49E-01	4.68E-02	0.0447	0.9139
SYWNIISTV	OR2D3	4.39E-07	4.84E-09	4.56E+04	4.74E+02	2.00E-02	7.23E-05	0.1373	0.9952
GVFNLI AVL	AC002365.5, LOC100288814	4.59E-07	4.94E-09	7.59E+04	7.70E+02	3.48E-02	1.26E-04	0.3268	0.9946
RLFNITSSA	IFITM10	4.74E-07	4.12E-08	2.51E+05	2.08E+04	1.19E-01	3.08E-03	0.0167	0.9706
NLWNLVAVI	WDR17	4.97E-07	1.16E-08	2.07E+05	4.34E+03	1.03E-01	1.04E-03	0.256	0.9836
RIFNLIGMM	HCN1,HCN3	4.98E-07	1.26E-08	2.29E+04	5.51E+02	1.14E-02	8.55E-05	0.0712	0.9889
RLFNVVSRG	TRPV2	5.02E-07	6.55E-09	6.50E+04	8.05E+02	3.26E-02	1.34E-04	0.1875	0.9931
LVFNVITPL	ABCB6	5.35E-07	3.99E-09	1.33E+05	9.21E+02	7.13E-02	2.00E-04	0.0445	0.9982
TTWNILSSA	COX1	5.36E-07	4.08E-08	2.26E+05	1.65E+04	1.21E-01	2.63E-03	0.0214	0.9794
KLFNVLSTL	NUP210P2	5.76E-07	3.35E-08	2.97E+05	1.65E+04	1.71E-01	2.83E-03	0.0131	0.9912
RVYNLTAKS	VWA3B	5.95E-07	4.57E-09	4.53E+04	3.35E+02	2.69E-02	5.65E-05	0.0219	0.9981
LTFNTISLS	ENTHD1	7.09E-07	2.12E-07	4.78E+05	1.37E+05	3.39E-01	2.72E-02	0.0387	0.929
AQFNLLSST	TP73	7.13E-07	9.97E-09	8.59E+04	1.15E+03	6.12E-02	2.58E-04	0.1658	0.9947
VVYNVLSEL	SP100,SP140L	7.35E-07	6.29E-08	1.84E+05	1.52E+04	1.35E-01	2.89E-03	0.0255	0.9785
KVYNTPTS	AEBP2	7.51E-07	1.39E-08	1.71E+05	2.91E+03	1.28E-01	9.13E-04	0.0718	0.9945
GIFNIIPST	CAPN7	7.90E-07	8.67E-09	1.32E+05	1.36E+03	1.04E-01	4.00E-04	0.0364	0.9979
NIYNTLSGL	UBR4	8.73E-07	1.71E-08	1.59E+05	2.89E+03	1.38E-01	9.89E-04	0.0564	0.9947
RLFNLTSTF	FLJ44715,FUT11	9.32E-07	2.82E-08	1.72E+05	4.83E+03	1.60E-01	1.79E-03	0.0525	0.9894
TVWNILSSL	DNAH9	9.39E-07	1.22E-08	4.52E+04	5.73E+02	4.25E-02	1.20E-04	0.0344	0.9971
RLFNMLSAV	CFAP221,PCDP1	9.71E-07	3.06E-08	1.73E+05	5.09E+03	1.68E-01	1.94E-03	0.0714	0.9892
SIWNVTAIA	HTR5A	1.10E-06	5.12E-07	3.21E+05	1.45E+05	3.54E-01	3.47E-02	0.0576	0.9051
ALFNLMSGI	EGR4	1.19E-06	3.21E-08	9.57E+04	2.48E+03	1.14E-01	8.53E-04	0.0645	0.9931

IVYNLLSAM	SLC39A10	1.30E-06	1.62E-07	1.61E+05	1.98E+04	2.10E-01	4.82E-03	0.0245	0.987
ISFNMLPSI	GPR98	1.37E-06	4.65E-08	1.24E+05	4.04E+03	1.70E-01	1.70E-03	0.0581	0.991
NTYNILPGS	C9orf173	1.38E-06	1.17E-07	1.14E+05	9.57E+03	1.57E-01	2.30E-03	0.025	0.9925
RLWNMVNV T	IL12RB2	1.39E-06	2.57E-07	1.52E+05	2.77E+04	2.11E-01	6.87E-03	0.049	0.9763
SAFNITSLI	WAC	1.41E-06	3.21E-07	1.65E+05	3.70E+04	2.32E-01	9.29E-03	0.0314	0.9682
NIFNLPNIV	OMD	1.48E-06	6.62E-07	4.19E+05	1.85E+05	6.20E-01	4.90E-02	0.0905	0.9596
GVYNLPGAS	GPX2	1.58E-06	3.07E-07	1.17E+05	2.23E+04	1.84E-01	5.65E-03	0.0488	0.9756
GTYNVISLV	TRPC4,TRPC5	1.64E-06	4.18E-07	1.23E+05	3.10E+04	2.02E-01	8.00E-03	0.0666	0.965
SIFNTLSDI	SGSM3	1.97E-06	5.86E-08	4.07E+04	1.20E+03	8.01E-02	3.78E-04	0.0856	0.9957
TIFNILSGI	ABCA3	2.66E-06	2.37E-07	4.68E+04	4.13E+03	1.24E-01	1.66E-03	0.1728	0.9807
LLFNLISSS	MON1A	2.79E-06	2.57E-06	1.51E+05	1.38E+05	4.20E-01	4.10E-02	0.0599	0.9183
RTFNLTAGS	PDXDC1	2.85E-06	5.89E-07	4.63E+04	9.54E+03	1.32E-01	2.56E-03	0.0356	0.9845
TVFNILPGG	PAFAH2	3.23E-06	1.06E-06	3.69E+04	1.21E+04	1.19E-01	3.22E-03	0.025	0.968
GLFNIPPAS	CYP2S1	3.91E-06	4.13E-06	8.52E+04	8.97E+04	3.33E-01	2.74E-02	0.0395	0.9216
RMFNIISDS	RASA1	3.99E-06	4.08E-07	1.51E+04	1.54E+03	6.02E-02	4.39E-04	0.0509	0.9862
TTFNIVGTT	GABRA3	6.79E-06	3.10E-06	8.68E+03	3.96E+03	5.89E-02	8.72E-04	0.0351	0.9743
ALFNLMMSGV	EGR4	7.87E-06	1.14E-05	3.17E+04	4.60E+04	2.50E-01	1.45E-02	0.1115	0.9454
SVFNITAIA	MTNR1B	1.96E-05	2.39E-04	2.58E+04	3.15E+05	5.06E-01	1.06E-01	0.2805	0.7869
KIYNTPSAS	NCAM1	2.56E-05	2.88E-05	8.86E+03	9.95E+03	2.27E-01	5.62E-03	0.2474	0.9662
LLYNLLGSS	ABCC9	1.41E-04	6.82E-03	3.21E+03	1.55E+05	4.54E-01	5.27E-02	0.1153	0.9007
SLYNMMGE A	TMTC2	Неподходящ ие							
SLWNLGMN A	LMAN2L	Неподходящ ие							
GLYNIVGNA	SUMF1	Неподходящ ие							
LWNLTPKA	DLEC1	Неподходящ ие							
LIFNVTGLA	ZDHHC23	Неподходящ ие							
SIFNITGIA	MTNR1A	Неподходящ ие							
LTFNLVSDA	CASP8AP2	Неподходящ ие							
MQWNILAQ A	CCRN4L	Неподходящ ие							
LSWNLVPEA	COL7A1	Неподходящ ие							
DLWNTLSEA	TRHDE	Неподходящ ие							
GLFNIPPAF	CYP2S1	Неподходящ ие							
LIWNILASF	TTC29	Неподходящ ие							
LLFNMLPGG	EXT2	Неподходящ ие							
LVYNIMSSG	FAM120B	Неподходящ ие							
IYNVPGTG	RNF133	Неподходящ ие							
VIYNVTSDG	TTN	Неподходящ ие							
GTFNLPSDG	BAG6	Неподходящ ие							
KLWNTLNLI	ENPP5	Неподходящ ие							

LMWNIISII	VTCN1	Неподходящ ие							
GLFNTTSNI	SEMA3E	Неподходящ ие							
LIFNTLSLI	PDCD6IP	Неподходящ ие							
SVFNLMNAI	SLC38A6	Неподходящ ие							
LTFNILGQI	DOCK11	Неподходящ ие							
GLFNMVSSL	RRN3	Неподходящ ие							
KIFNIINSL	FER1L5	Неподходящ ие							
AVWNVLGNL	BAG5	Неподходящ ие							
KVFNIVSDL	FSIP2	Неподходящ ие							
DLWNVVSHL	DDX60L	Неподходящ ие							
LQFNTVSKL	JAM2	Неподходящ ие							
MSFNTVSEL	ZNF33A,ZNF33B	Неподходящ ие							
ASWNIVNLL	TRPA1	Неподходящ ие							
ISFNIISAL	MS4A18	Неподходящ ие							
AFFNILNEL	FBNP1L	Неподходящ ие							
LVFNLLPIM	ABCB7	Неподходящ ие							
KIFNTVPDM	ARHGAP26	Неподходящ ие							
MLFNLIGLS	OR10J1	Неподходящ ие							
LLFNLPPTS	VGLL1	Неподходящ ие							
MTFNLIGES	CR1,CR1L	Неподходящ ие							
KVYNIPGIS	KLHL10	Неподходящ ие							
GIYNIPGDS	TNS1	Неподходящ ие							
GLYNLMNIT	INSR	Неподходящ ие							
LTWNMINTT	LRIT3	Неподходящ ие							
IVFNVLSDT	HCN3	Неподходящ ие							
IVFNVVSDT	HCN2,HCN4	Неподходящ ие							
LIFNITASV	SVEP1	Неподходящ ие							
IVFNLTNNV	MNAT1	Неподходящ ие							
KSFNVLSSV	ZNF557	Неподходящ ие							
LAFNILGMV	SLC46A1	Неподходящ ие							
VSWNITGTV	SEH1L	Неподходящ ие							

Один из них, ALYNVLAKV (SEQ ID NO: 1), следует отметить особенно. Он был выбран в качестве теоретического пептида, но был обнаружен, кроме того, в образцах тканей и в линиях клеток согласно банку данных иммунопептидомики XPRESIDENT®. Этот банк данных комбинирует количественную пептидомику HLA на основе данных анализа методом ЖХ-МС и количественную транскриптомику,

обеспечиваемую за счет последовательностей РНК (RNAseq) из здоровых тканей и опухолевых тканей, в целях идентификации пептидов, которые эксклюзивно или преимущественно презентруются на опухолевой ткани (28, 29). ALYNVLAKV, антиген из семейства промежуточных филаментов orphan 1 или 2 (IFFO1/2), был обнаружен на многочисленных образцах здоровых тканей и образцах опухолевых тканей, охватывающих голову и шею, селезенку или почки вплоть до немелкоклеточной карциномы легких или почечно-клеточной карциномы. Измеренный результат аффинности связывания K_D комплекса рМНС-bsTKP составил 65,9 нМ (Фиг. 4с). Авторам изобретения удалось идентифицировать второй пептид, обнаруженный с помощью ЖХ-МС, KTFNLIPAV (SEQ ID NO: 226), с более низким K_D , составлявшем 413 нМ, который был обнаружен на трех образцах опухолевой ткани.

22. Корреляция аффинности ТКР с активацией Т-клеток

Аффинность связывания рМНС с bsTKP может быть измерена с помощью данной платформы высокопроизводительного скрининга, но она должна согласовываться с активностью *in vitro* функциональных Т-клеток, привлекающих bsTKP, чтобы быть еще более полезной. Обычно для характеристики данных структур используются совместная инкубация *in vitro* клеток-мишеней и эффекторных клеток вместе с проходящим считыванием. Эффекторные клетки GloResponse™ NFAT-luc2 Jurkat, клеточной линии, которая экспрессирует люциферазный репортерный ген, активируемый элементом отклика фактора NFAT, и нагруженные пептидом клетки-мишени T2, линия клеток A*02:01 с дефицитом TAP с восстанавливаемой презентацией рМНС за счет экзогенной загрузки пептидов, инкубировали в присутствии bs-868Z11-CD3, чтобы подтвердить значимость кинетического скрининга в настоящем контексте. Клетки T2 нагружали в отдельности соответствующими пептидами из библиотеки с перебором всех возможных аминокислот в определенном положении пептида для оптимизации последовательности при концентрации 100 нМ, а затем совместно инкубировали с клетками Jurkat и различными концентрациями bsTKP в течение 18 часов до считывания. Как ожидалось, авторы изобретения столкнулись с широким спектром результатов, от не поддающейся обнаружению активации Т-клеток при всех концентрациях bsTKP до сильных ответов, начиная уже с низких концентраций, например, для пептида дикого типа (Фигура 5а). Так как для многих взаимодействий значения EC50 не могли быть определены в выбранном диапазоне концентраций

bsTKP, авторы изобретения классифицировали отдельные пептиды по началу активации Т-клеток, принятой за наиболее низкую концентрацию bsTKP, которая была в состоянии вызвать 3-кратное повышение сигнала. Значения начала этого процесса представлены на графике зависимости от соответствующих измеренных значений K_d (Фигура 5b).

В целом, авторы изобретения выявили хорошую корреляцию между определенными значениями K_d и активацией Т-клеток с одной выделяющейся группой резко отклоняющихся значений с сильной аффинностью связывания pMHC-bsTCR, но поздним началом активации Т-клеток или вообще с отсутствием активации. Авторам изобретения удалось установить прямую взаимосвязь между этими пептидами и силой их связывания с молекулами MHC, предсказанной с помощью алгоритма NetMHC (Фигура 5c) (26). Это дало потенциальное объяснение, поскольку различные аффинности связывания пептидов могут приводить к различным уровням презентации соответствующих комплексов pMHC на клетках-мишенях после экзогенной загрузки. Эти уровни, возможно, в свою очередь, оказывают влияние на численность комплексов pMHC и bsTKP и, наконец, активацию эффекторов (для Т-клеток) Jurkat. Для подкрепления гипотезы авторы изобретения провели анализ связывания пептида с T2 методом проточной цитометрии с использованием антител к HLA-A2 и после загрузки пептидов могли выявить менее повышенные поверхностные уровни HLA-A2 для пептидов с более низкими аффинностями связывания, в особенности для ранга 2 и выше по NetMHC, что подтверждает первоначальную гипотезу. Аффинность связывания pMHC-bsTKP хорошо коррелировала с началом активации Т-клеток в случае пептидных лигандов рангов от 0,05 до 2 согласно NetMHC, причем выше данного порогового значения уровень активации Т-клеток падал с дальнейшим возрастанием ранга согласно NetMHC, преимущественно независимо от аффинности связывания pMHC-bsTCR.

Авторы изобретения также провели анализ активации Т-клеток для 140 пептидных лигандов, выбранных с помощью поиска мотива связывания, 24 были в состоянии индуцировать 3-кратную активацию Т-клеток в сравнении с фоновым значением по меньшей мере при одной из использованных концентраций bsTKP (Фигура 5d). Измеренные уровни K_d коррелировали с началом активации Т-клеток в равной степени, как и результаты, полученные с помощью библиотеки с перебором всех

возможных аминокислот в определенном положении пептида для оптимизации последовательности. Подчеркнутый ранее антиген IFFO1 ALYNVLAKV (SEQ ID NO: 1) также реагировал в анализе активности репортерного гена (Фигура 5e).

Авторы изобретения показали, что аффинность связывания pMHC с bsTKP является хорошим индикатором для функции *in vitro* scTv 868Z11, в сочетании с активатором Т-клеток, антителом к CD3. Это подчеркивает значение платформы скрининга кинетики связывания pMHC с bsTKP, поскольку она позволяет быстро, но адекватно характеризовать bsTCR на ранних стадиях разработки таких молекул.

23. Кристаллическая структура конструкции 1G4 Y84C/A139C HLA-A*02:01:01 ESO 9V TCR-pMHC

Чтобы далее подтвердить, что TKP 1G4 распознает ESO 9V Y84C/A139C HLA-A*02:01 неразличимо от ESO 9V WT-A*02:01, TKP и дисульфид стабилизированную молекулу MHC после рефолдинга с ESO 9V подвергали совместной кристаллизации, как об этом сообщалось ранее для молекулы дикого типа ESO 9V HLA-A*02:01, и анализировали с помощью рентгеноструктурного анализа (Таблица 2) (21). Сравнение кристаллических структур обнаружило высокую степень перекрывающихся структурных фрагментов между обоими комплексами. Каркас обоих молекул HLA-A*02:01 давал практически идеальное выравнивание со значением среднеквадратического отклонения (RMSD) 1,14 Å, рассчитанным по C α (константной области α -цепи Т-клеточного рецептора; Фиг. 7A). Это также правомерно для обоих связывающихся пептидов, в том числе их боковых цепей со значением RMSD 1,27 Å, рассчитанным по всем атомам, даже если они находились в непосредственной близости к дисульфидной связи (Фиг. 7B). Подобные заключения могли быть сделаны для взаимодействия с TKP 1G4. Петлевые области определяющего комплементарность участка (CDR), взаимодействующие с пептидом и каркасом молекулы MHC, в самом деле проявляли незначительные отклонения на поверхности взаимодействия и небольшое изменение угла связывания в 4,13° в сравнении кристаллических структур WT-A*02:01 1G4 с Y84C/A139C HLA-A*02:01 1G4. Данный сдвиг находился, тем не менее, в пределах ожидаемых отклонений для того же комплекса при повторной кристаллизации (Фиг. 7, C и D). При рассмотрении в совокупности определенные аффинности связывания и кристаллическая структура дает наглядную картину восприимчивости к пептидам и схожие характеристики комплексов Y84C/A139C HLA-A*02:01 pMHC в

сравнении с комплексами дикого типа в отношении связывания с ТКР. Кристаллическая структура комплекса 1G4 Y84C/A139C HLA-A*02:01 ESO 9V была размещена в банке данных PDB под инвентарным номером 6Q3S.

24. Обсуждение

В настоящем контексте авторы изобретения представили дисульфид-стабилизированные и функционально пустые молекулы HLA-A*02:01, которые могут подвергаться рефолдингу и быть очищены без применения высокоаффинных пептидов, требующихся в обычных условиях, например, дипептида ГМ. Полученные в результате мономеры могут образовывать комплексы рМНС после добавления пептидов в рамках одноэтапного процесса загрузки. Хотя дисульфидный мостик усиливает стабильность молекулы МНС, его введение не ингибирует или существенно не изменяет связывание ТКР с дисульфид-модифицированными комплексами рМНС с HLA*02:01 по сравнению с диким типом. Эта методика представляет собой первоклассный инструмент для быстрого получения масштабных библиотек рМНС, которые подходят для измерений аффинности. Комбинация библиотеки комплексов рМНС, полученных с дисульфид-модифицированными молекулами HLA*02:01, с анализом, основанным на биослойной интерферометрии, позволяет создать платформу, способную производить высокопроизводительный скрининг кинетики связывания рМНС-bsТКР. Данный протокол мог быть также полезным для анализа других биологических препаратов, мишенями которых являются комплексы рМНС, таких как моноклональные антитела или такие биспецифики, как биспецифические активаторы Т-клеток. В одном виде применения данной платформы авторам изобретения удалось быстро собрать набор данных по аффинности связывания рМНС-bsТКР для ВИЧ-специфического bsТКР bs-868Z11-CD3. Аффинности связывания bsТКР для соответствующих комплексов рМНС были индикаторами активности *in vitro*, когда они были связаны с представленным активатором Т-клеток и испытаны в клеточном анализе активности репортерных генов, делая эти наборы данных ценными для характеристики bsТКР. Было сложно провести анализ взаимосвязи между аффинностью связывания и опосредованной bsТКР активацией клеток в широком ряду значений аффинности рМНС-bsТКР вследствие наличия вплоть до настоящего времени лишь ограниченного числа инструментов, которые были бы практически применимы для создания таких наборов данных.

Собранная информация о связывающем мотиве обнаружила сходство со связывающим мотивом ТКР 868 дикого типа. Анализ кристаллической структуры 868-SV9, а также проведенное в сопровождении сканирование аланином по Cole и соавт. (34), обнаружили заметные взаимодействия между областью CDR3 α и аминокислотами 4N и 5T пептида SLYNTVATL. Это поведение, возможно, является консервативным, хотя и существенная часть CDR3 α в структуре 868Z11 имеет мутации. Используя связывающий мотив и стратегию поиска модели, авторам изобретения удалось идентифицировать множество пептидов из протеома человека, которые демонстрировали высокоаффинное взаимодействие с bsТКР и потенциал для индукции опосредованной bsТКР активации эффекторных клеток Jurkat в случае презентации на клетках-мишенях.

Примечательно, что мотивы, связывающиеся с ТКР, которые получены из библиотек с заменой отдельной аминокислоты, все же могут не отражать все возможные пептиды, которые может распознавать специфический ТКР (sТКР), поскольку замена нескольких аминокислот одновременно может оказывать другое влияние, чем отдельные замены. Альтернативные подходы включают скрининг более сложных библиотек, например, за счет загрузки клеток-мишеней из пулов пептидов с высоким многообразием, каждый из которых рандомизирован во всех, кроме одного положения, или скрининг библиотек рандомизированных пептидов, презентируемым в виде комплексов рМНС на поверхности клеток дрожжей (10, 32, 33). Чтобы добиться более глубокого понимания соответствующих сильных и слабых сторон, будут необходимы дальнейшие исследования с прямым сравнением данных подходов. Наконец, чтобы минимизировать риски, скрининг на безопасность кандидатов для клинического применения должен всегда основываться на нескольких подходах, например, на комбинации анализа с использованием связывающего мотива с клеточными скринингами обширных массивов клеточных линий из здоровых тканей. Результаты, представленные в настоящем контексте, подчеркивают способность данного подхода идентифицировать представляющие потенциальный интерес нецелевые взаимодействия в комбинации с платформой для скрининга кинетики связывания рМНС-bsТКР. Поскольку он предоставляет возможность быстрого анализа сложных библиотек рМНС, он может использоваться на ранних стадиях процесса разработки для выбора многообещающих кандидатов и, тем самым, дополняет существующие

способы. Эта платформа может также упростить более обширные и всеобъемлющие скрининги кандидатов на поздних стадиях разработки, потенциально проводимые в библиотеках опухоль-специфических pMHC на основании масс-спектрометрических данных, охватывающих известный иммунопептидом. За счет ее стабильности и процедуре загрузки пептида, не требующей больших затрат, дисульфид-модифицированные молекулы HLA*02:01 могли бы потенциально стать основой для еще более высокопроизводительных платформ. Благодаря этим свойствам она бы идеально подошла для создания высокосложных микроматриц pMHC с тысячами различных комплексов pMHC, например, за счет комбинации широкомасштабного покрытия дисульфид-модифицированных молекул HLA*02:01 и высокопроизводительной технологии современных струйных принтеров для пептидных микроматриц.

Цитируемая литература

1. Rammensee, H. G., Falk, K. & Rötzschke, O. Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 213–44 (1993).
2. Garboczi, D. N. *et al.* HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and complexed with single antigenic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 3429–3433 (1992).
3. Altman, J. D. *et al.* Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* (80-.). 274, 94–96 (1996).
4. Hadrup, S. R. *et al.* High-throughput T-cell epitope discovery through MHC peptide exchange. *Methods Mol. Biol.* 524, 383–405 (2009).
5. Garcia, K. C. *et al.* Alphabeta T cell receptor interactions with syngeneic and allogeneic ligands: affinity measurements and crystallization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 13838–43 (1997).
6. Stone, J. D. & Kranz, D. M. Role of T Cell Receptor Affinity in the Efficacy and Specificity of Adoptive T Cell Therapies. *Front. Immunol.* 4, 1–16 (2013).
7. Robbins, P. F. *et al.* Single and dual amino acid substitutions in TCR CDRs can enhance antigen-specific T cell functions. *J. Immunol.* 180, 6116–6131 (2008).
8. Varela-Rohena, A. *et al.* Control of HIV-1 immune escape by CD8 T cells expressing enhanced T-cell receptor. *Nat. Med.* 14, 1390–1395 (2008).
9. Oates, J., Hassan, N. J. & Jakobsen, B. K. ImmTACs for targeted cancer therapy: Why, what, how, and which. *Mol. Immunol.* 67, 67–74 (2015).
10. Wooldridge, L. *et al.* A single autoimmune T cell receptor recognizes more than a

million different peptides. *J. Biol. Chem.* 287, 1168–1177 (2012).

11. Cameron, B. J. *et al.* Identification of a Titin-derived HLA-A1-presented peptide as a cross-reactive target for engineered MAGE A3-directed T cells. *Sci. Transl. Med.* 5, 197ra103 (2013).
12. Linette, G. P. *et al.* Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma. *Blood* 122, 863–871 (2013).
13. Raman, M. C. C. *et al.* Direct molecular mimicry enables off-target cardiovascular toxicity by an enhanced affinity TCR designed for cancer immunotherapy. *Sci. Rep.* 6, 18851 (2016).
14. Bijen, H. M. *et al.* Preclinical Strategies to Identify Off-Target Toxicity of High-Affinity TCRs. *Mol. Ther.* (2018). doi:10.1016/J.YMTHE.2018.02.017
15. Shao, W. *et al.* The SystemMHC Atlas project. *Nucleic Acids Res.* 46, D1237–D1247 (2018).
16. Zacharias, M. & Springer, S. Conformational Flexibility of the MHC Class I $\alpha 1$ - $\alpha 2$ Domain in Peptide Bound and Free States: A Molecular Dynamics Simulation Study. *Biophys. J.* 87, 2203–2214 (2004).
17. Hein, Z. *et al.* Peptide-independent stabilization of MHC class I molecules breaches cellular quality control. *J. Cell Sci.* 127, 2885–97 (2014).
18. Saini, S. K. *et al.* Not all empty MHC class I molecules are molten globules: Tryptophan fluorescence reveals a two-step mechanism of thermal denaturation. *Mol. Immunol.* 54, 386–396 (2013).
19. Saini, S. K. *et al.* Dipeptides promote folding and peptide binding of MHC class I molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 15383–15388 (2013).
20. Boulter, J. M. *et al.* Stable, soluble T-cell receptor molecules for crystallization and therapeutics. *Protein Eng.* 16, 707–711 (2003).
21. Chen, J.-L. *et al.* Structural and kinetic basis for heightened immunogenicity of T cell vaccines. *J. Exp. Med.* 201, 1243–55 (2005).
22. Aggen, D. H. *et al.* Identification and engineering of human variable regions that allow expression of stable single-chain T cell receptors. *Protein Eng. Des. Sel.* 24, 361–372 (2011).
23. Zhu, Z. & Carter, P. Identification of heavy chain residues in a humanized anti-CD3 antibody important for efficient antigen binding and T cell activation. *J. Immunol.* 155, 1903–10 (1995).
24. Burrows, S. R., Rodda, S. J., Suhrbier, A., Geysen, H. M. & Moss, D. J. The specificity of recognition of a cytotoxic T lymphocyte epitope. *Eur. J. Immunol.* 22, 191–

195 (1992).

25. Rodenko, B. *et al.* Generation of peptide-MHC class I complexes through UV-mediated ligand exchange. *Nat. Protoc.* 1, 1120–1132 (2006).
26. Andreatta, M. & Nielsen, M. Gapped sequence alignment using artificial neural networks: application to the MHC class I system. *Bioinformatics* 32, 511–517 (2016).
27. Thomsen, M. C. F. & Nielsen, M. Seq2Logo: a method for construction and visualization of amino acid binding motifs and sequence profiles including sequence weighting, pseudo counts and two-sided representation of amino acid enrichment and depletion. *Nucleic Acids Res.* 40, W281-7 (2012).
28. Weinschenk, T. *et al.* Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Clin. Cancer Res.* 62, 5818–5827 (2002).
29. Fritsche, J. *et al.* Translating Immunopeptidomics to Immunotherapy-Decision-Making for Patient and Personalized Target Selection. *Proteomics* 18, 1700284 (2018).
30. Elliott, T., Willis, A., Cerundolo, V. & Townsend, A. Processing of major histocompatibility class I-restricted antigens in the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Med.* 181, 1481–1491 (1995).
31. Bossi, G. *et al.* Examining the presentation of tumor-associated antigens on peptide-pulsed T2 cells. *Oncoimmunology* 2, e26840 (2013).
32. Birnbaum, M. E. *et al.* Deconstructing the peptide-MHC specificity of t cell recognition. *Cell* 157, 1073–1087 (2014).
33. Gee, M. H. *et al.* Antigen Identification for Orphan T Cell Receptors Expressed on Tumor-Infiltrating Lymphocytes. *Cell* 172, 549–563.e16 (2018).
34. Cole, D. K. *et al.* Dual molecular mechanisms govern escape at immunodominant HLA A2-restricted HIV epitope. *Front. Immunol.* 8, 1503 (2017).
35. Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 125-132 (2010).
36. Evans, P. Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 62, 72-82 (2006).
37. Vagin, A. *et al.* Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 66, 22-25 (2010).
38. Kovalevskiy, O. *et al.* Overview of refinement procedures within REFMAC 5: Utilizing data from different sources. *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.* 74, 215-227 (2018).
39. Emsley, P. *et al.* Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 66, 486-501 (2010).
40. Chen, V. B. *et al.* MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular

crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 66, 12-21 (2010).

41. S. K. Saini, T. Tamhane, R. Anjanappa, A. Saikia, S. Ramskov, M. Donia, I. M. Svane, S. N. Jakobsen, M. Garcia-Alai, M. Zacharias, R. Meijers, S. Springer, S. R. Hadrup, Empty peptide-receptive MHC class I molecules for efficient detection of antigen-specific T cells. *Sci. Immunol.* 4, 37 eaau9039, 07-19 (2019).

Формула изобретения

1. Способ скрининга на связывающийся с ТКР комплекс пептидного лиганда и молекулы МНС (рМНС), включающий этапы:
 - а) обеспечения стабилизированной подходящим образом молекулы МНС, где указанная молекула МНС включает по меньшей мере один искусственно введенный ковалентный мостик:
 - (i) между одной аминокислотой альфа-1-домена и одной аминокислотой альфа-2-домена указанной стабилизированной молекулы МНС в случае МНС I; и/или
 - (ii) между двумя аминокислотами альфа-1-домена указанной стабилизированной молекулы МНС в случае МНС I; или
 - (iii) между двумя аминокислотами альфа-1-домена или бета-1-домена указанной стабилизированной молекулы МНС в случае МНС II; и/или
 - (iv) между одной аминокислотой альфа-1-домена и одной аминокислотой бета-1-домена указанной стабилизированной молекулы МНС в случае МНС II;
 - б) контактирования указанной стабилизированной подходящим образом молекулы МНС с множеством ее пептидных лигандов в целях получения комплексов пептидного лиганда и молекулы МНС (рМНС), и
 - в) скрининг указанных комплексов молекулы рМНС на наличие связывания с ТКР.
2. Способ в соответствии с п. 1, в котором указанная молекула МНС является HLA или мультимером HLA, МНС I или МНС II, выбранным из группы, состоящей из димера, тримера и тетрамера.
3. Способ в соответствии с п. 1 или п. 2, в котором указанный по меньшей мере один искусственно введенный ковалентный мостик между аминокислотами выбран из дисульфидного мостика, введенного с помощью рекомбинантных технологий, введения не встречающихся в природе аминокислот, предназначенных для поперечной сшивки, введения аминокислот для фотосшивки и поперечных сшивок, введенных химическим путем.

4. Способ в соответствии с любым из пп. 1–3, в котором указанный по меньшей мере один искусственно введенный ковалентный мостик между аминокислотами введен:
 - (i) между α -спиралями, предпочтительно, за счет мутации аминокислоты в положении 84 и аминокислоты в положении 139 в цистеины молекулы МНС I;
 - (ii) между α -спиралями и β -листами домена альфа-1 молекулы МНС I, предпочтительно, за счет мутации аминокислоты в положении 71 молекулы МНС I и аминокислоты в положении 22 молекулы МНС I в цистеины;
 - (iii) между α -спиралями, предпочтительно, за счет мутации аминокислоты в положении 51 молекулы МНС I и аминокислоты в положении 175 молекулы МНС I в цистеины; или
 - (iv) между α -спиралями и β -листами, предпочтительно, за счет мутации аминокислоты в положении 71 молекулы МНС I и аминокислоты в положении 22 молекулы МНС I в цистеины; и между α -спиралями, предпочтительно, за счет мутации аминокислоты в положении 51 молекулы МНС I и аминокислоты в положении 175 молекулы МНС I в цистеины.
5. Способ в соответствии с любым из пп. 1–4, в котором указанные нагруженные молекулы HLA/пептид являются стабильными в течение более чем 1 дня, и – предпочтительно – более чем 1 недели при примерно 4° С.
6. Способ в соответствии с любым из пп. 1–5, в котором уровень чувствительности для скрининга аффинности связывания ТКР с комплексами рМНС выше, чем примерно K_d $1,0 \times 10^{-9}$, предпочтительно – выше, чем примерно K_d $1,0 \times 10^{-6}$, и – наиболее предпочтительно – выше, чем примерно K_d $1,0 \times 10^{-3}$.
7. Способ в соответствии с любым из пп. 1–6, в котором либо ТКР, либо молекула МНС надлежащим образом иммобилизована на твердой поверхности, выбранной из группы, состоящей из чипа, биосенсора, предметного стекла или микрогранулы.

8. Способ в соответствии с любым из пп. 1–7, в котором указанный способ осуществляется в формате высокопроизводительного скрининга.
9. Полипептид, включающий или состоящий из стабилизированной молекулы МНС или ее фрагмента, связывающегося с пептидом, причем указанная молекула МНС включает по меньшей мере один искусственно введенный ковалентный мостик между
 - (i) двумя аминокислотами в альфа-1-домене молекулы МНС I; и/или
 - (ii) одной аминокислотой в альфа-1-домене молекулы МНС I и одной аминокислотой в альфа-2-домене молекулы МНС I в пределах положений аминокислот 160–179; или
 - (iii) двумя аминокислотами альфа-1-домена или двумя аминокислотами бета-1-домена МНС II; и/или
 - (iv) одной аминокислотой в альфа-1-домене молекулы МНС II и одной аминокислотой в бета-1-домене молекулы МНС II.
10. Полипептид в соответствии с п. 9, причем
 - (i) одна аминокислота модифицирована в модуле β 1 альфа-1 домена молекулы МНС I, а другая аминокислота в модуле α 1 альфа-1 домена молекулы МНС I, предпочтительно, в пределах модуля β 1 в пределах положений аминокислот 12–32, предпочтительно, в пределах положений аминокислот 17–27, более предпочтительно, в пределах положений аминокислот 20–24 и наиболее предпочтительно – в положении аминокислоты 22, и в пределах модуля α 1 в пределах положений аминокислот 61–81, предпочтительно, в пределах положений аминокислот 66–76, более предпочтительно, в пределах положений аминокислот 69–73 и наиболее предпочтительно – в положении аминокислоты 71; и/или
 - (ii) одна аминокислота модифицирована в модуле α 1 альфа-1 домена, предпочтительно, в пределах положений аминокислот 50–70, более предпочтительно, в пределах положений аминокислот 50–60, более предпочтительно 50–54 и наиболее предпочтительно в положении аминокислоты 51, а другая аминокислота, модифицированная в пределах альфа-2 домена, расположена в пределах положений

аминокислот 165–178, предпочтительно, в пределах положений аминокислот 170–177, более предпочтительно, в пределах положений аминокислот 173–176 и наиболее предпочтительно в положении аминокислоты 175; или

- (iii) одна аминокислота модифицирована в модуле $\beta 1$ альфа-1 домена молекулы МНС II, а другая аминокислота – в модуле $\alpha 1$ альфа-1 домена молекулы МНС II, предпочтительно в пределах модуля $\beta 1$ в пределах положений аминокислот 10–40, предпочтительно, в пределах положений аминокислот 13–35, более предпочтительно, в пределах положений аминокислот 22–25 и наиболее предпочтительно – в положении аминокислоты 22, и в пределах модуля $\alpha 1$ в пределах положений аминокислот 45–78, предпочтительно, в пределах положений аминокислот 50–70, более предпочтительно, в пределах положений аминокислот 56–66 и наиболее предпочтительно – в положении аминокислоты 59; и/или
- (iv) одна аминокислота модифицирована в модуле $\beta 3$ бета-1 домена молекулы МНС II, а другая аминокислота в модуле $\alpha 3$ бета-1 домена молекулы МНС II, предпочтительно, в пределах модуля $\beta 3$ в пределах положений аминокислот 5–53, предпочтительно, в пределах положений аминокислот 17–41, более предпочтительно, в пределах положений аминокислот 21–28 и наиболее предпочтительно – в положении аминокислоты 26, и в пределах модуля $\alpha 3$ в пределах положений аминокислот 52–88, предпочтительно, в пределах положений аминокислот 66–76, более предпочтительно, в пределах положений аминокислот 65–80 и наиболее предпочтительно – в положении аминокислоты 75; и/или
- (v) одна аминокислота модифицирована в модуле $\alpha 3$ бета-1 домена молекулы МНС II, а другая аминокислота в модуле $\alpha 1$ альфа-1 домена молекулы МНС II, предпочтительно, в пределах модуля $\alpha 3$ в пределах положений аминокислот 70–95, предпочтительно, в пределах положений аминокислот 74–94, предпочтительно, в пределах положений аминокислот 83–93, более предпочтительно, в пределах положений аминокислот 87–92 и наиболее предпочтительно – в положении аминокислоты 89, и в пределах модуля $\alpha 1$ в пределах положений

аминокислот 50–70, более предпочтительно, в пределах положений аминокислот 50–60, более предпочтительно в пределах положений аминокислот 50–54 и наиболее предпочтительно – в положении аминокислоты 51.

11. Полипептид в соответствии с п. 9 или п. 10, дополнительно включающий по меньшей мере один искусственный ковалентный мостик между аминокислотами альфа-1 домена и альфа-2 домена за счет мутации аминокислоты в положении 74–84, предпочтительно, в положении 84, и аминокислоты в положении 138–149, предпочтительно, в положении 139 молекулы МНС I в цистеины.
12. Способ обнаружения или получения специфического аминокислотного связывающего мотива для ТКР, включающий
 - а) осуществление способа в соответствии с любым из пп. 1–8, включающего предварительно выбранный ТКР, и
 - б) дополнительный этап определения и сравнения аминокислотных последовательностей тех пептидных лигандов в указанных комплексах пептидного лиганда и молекулы МНС, для которых было выявлено связывание с ТКР, за счет чего идентифицируется специфический связывающий аминокислотный мотив для указанного предварительно выбранного ТКР.
13. Способ в соответствии с п. 12, в котором указанные комплексы пептидного лиганда и молекулы МНС используются в параллельных аналитических реакциях в разных концентрациях, предпочтительно, в котором указанные этапы способа повторяются с включением пула пептидов, состоящих из связывающих мотивов из модифицированных аминокислот для указанного предварительно выбранного ТКР, который был идентифицирован.
14. Способ обнаружения или определения перекрестного взаимодействия ТКР, включающий
 - а) осуществление способа в соответствии с п. 12 или п. 13 и
 - б) дополнительный этап определения и сравнения аминокислотных последовательностей тех пептидных лигандов в указанных комплексах

пептидного лиганда и молекулы МНС, для которых было выявлено связывание с ТКР, за счет чего идентифицируется перекрестное взаимодействие указанного ТКР.

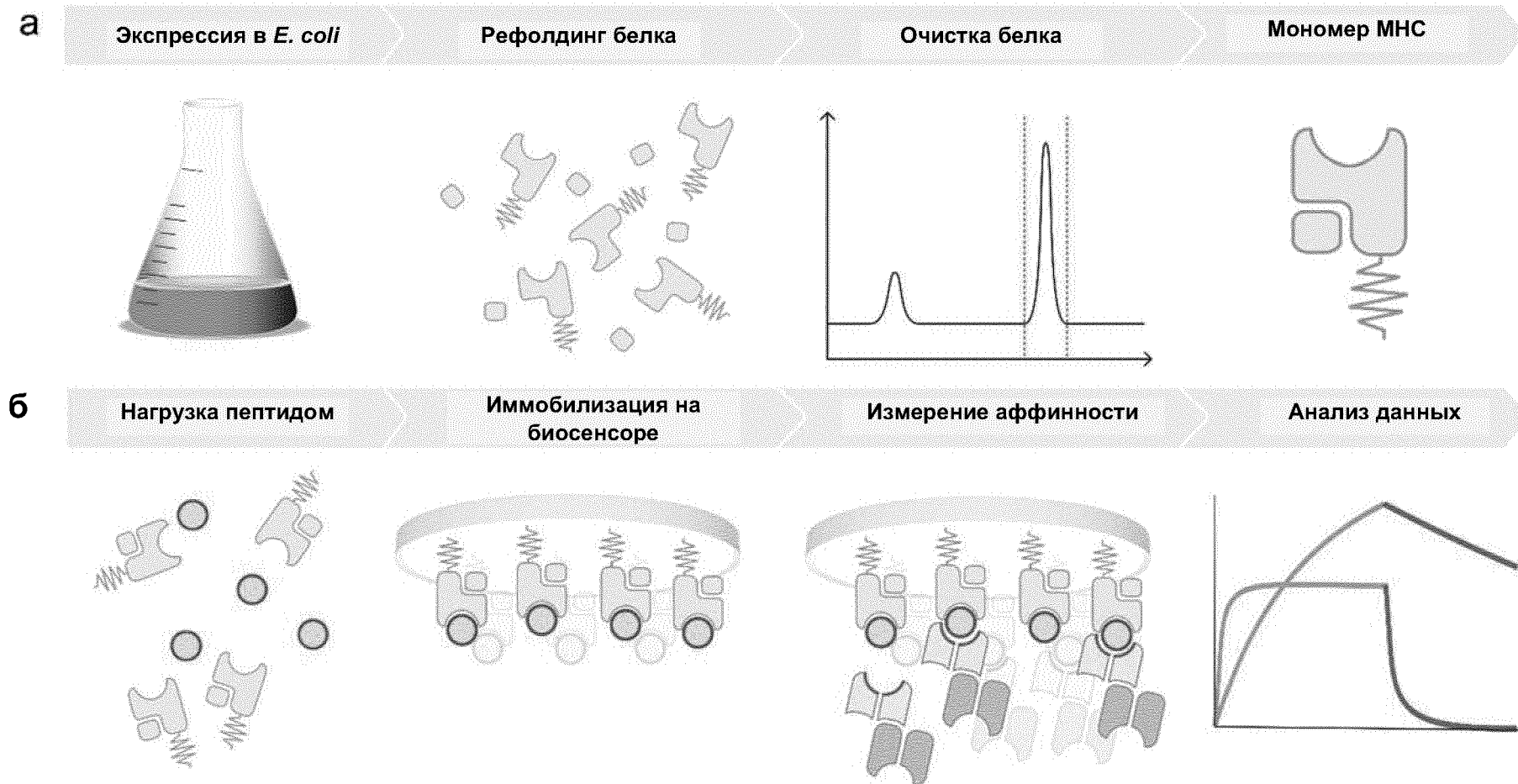
15. Способ обнаружения или определения перекрестного взаимодействия ТКР, включающий
 - а) осуществление способа в соответствии с любым из пп. 1–8, включающего предварительно выбранный ТКР, и
 - б) дополнительный этап определения и сравнения аминокислотных последовательностей тех пептидных лигандов в указанных комплексах пептидного лиганда и молекулы МНС, для которых было выявлено связывание с ТКР, за счет чего идентифицируется перекрестное взаимодействие указанного ТКР.
16. Способ в соответствии с любым из пп. 1–8 или пп. 12–15, дополнительно включающий этап измерения активации Т-клеток, включающей ТКР и комплекс связывающегося с ТКР пептидного лиганда и молекулы МНС, который связывается с указанным ТКР.
17. Фармацевтическая композиция, включающая полипептид, включающий или состоящий из стабилизированной молекулы МНС или ее фрагмента, связывающегося с пептидом, причем указанная молекула МНС включает по меньшей мере
 - (i) две аминокислоты в альфа-1 домене молекулы МНС I; и/или
 - (ii) одну аминокислоту в альфа-1 домене молекулы МНС I и одну аминокислоту в альфа-2 домене молекулы МНС I в пределах положений аминокислот 160–179; или
 - (iii) две аминокислоты в альфа-1 домене или две аминокислоты в бета-1 домене молекулы МНС II; и/или
 - (iv) одну аминокислоту в альфа-1 домене молекулы МНС II и одну аминокислоту в бета-1 домене молекулы МНС II;причем указанная стабилизированная молекула МНС связана с микрогранулой, волокном, наночастицей или другим подходящим носителем и факультативно нагружена пептидным лигандом.

18. Фармацевтическая композиция, включающая полипептид в соответствии с п. 17, в котором
- (i) одна аминокислота модифицирована в модуле $\beta 1$ альфа-1 домена молекулы МНС I, а другая аминокислота в модуле $\alpha 1$ альфа-1 домена молекулы МНС I, предпочтительно, в пределах модуля $\beta 1$ в пределах положений аминокислот 12–32, предпочтительно, в пределах положений аминокислот 17–27, более предпочтительно, в пределах положений аминокислот 20–24 и наиболее предпочтительно – в положении аминокислоты 22, и в пределах модуля $\alpha 1$ в пределах положений аминокислот 61–81, предпочтительно, в пределах положений аминокислот 66–76, более предпочтительно, в пределах положений аминокислот 69–73 и наиболее предпочтительно – в положении аминокислоты 71; и/или
 - (ii) одна аминокислота модифицирована в модуле $\alpha 1$ альфа-1 домена, предпочтительно, в пределах положений аминокислот 50–70, более предпочтительно, в пределах положений аминокислот 50–60, более предпочтительно 50–54 и наиболее предпочтительно в положении аминокислоты 51, а другая аминокислота, модифицированная в пределах альфа-2 домена, расположена в пределах положений аминокислот 165–178, предпочтительно, в пределах положений аминокислот 170–177, более предпочтительно, в пределах положений аминокислот 173–176 и наиболее предпочтительно в положении аминокислоты 175; или
 - (iii) одна аминокислота модифицирована в модуле $\beta 1$ альфа-1 домена молекулы МНС II, а другая аминокислота – в модуле $\alpha 1$ альфа-1 домена молекулы МНС II, предпочтительно в пределах модуля $\beta 1$ в пределах положений аминокислот 10–40, предпочтительно, в пределах положений аминокислот 13–35, более предпочтительно, в пределах положений аминокислот 22–25 и наиболее предпочтительно – в положении аминокислоты 22, и в пределах модуля $\alpha 1$ в пределах положений аминокислот 45–78, предпочтительно, в пределах положений аминокислот 50–70, более предпочтительно, в пределах положений аминокислот 56–66 и наиболее предпочтительно – в положении аминокислоты 59; и/или

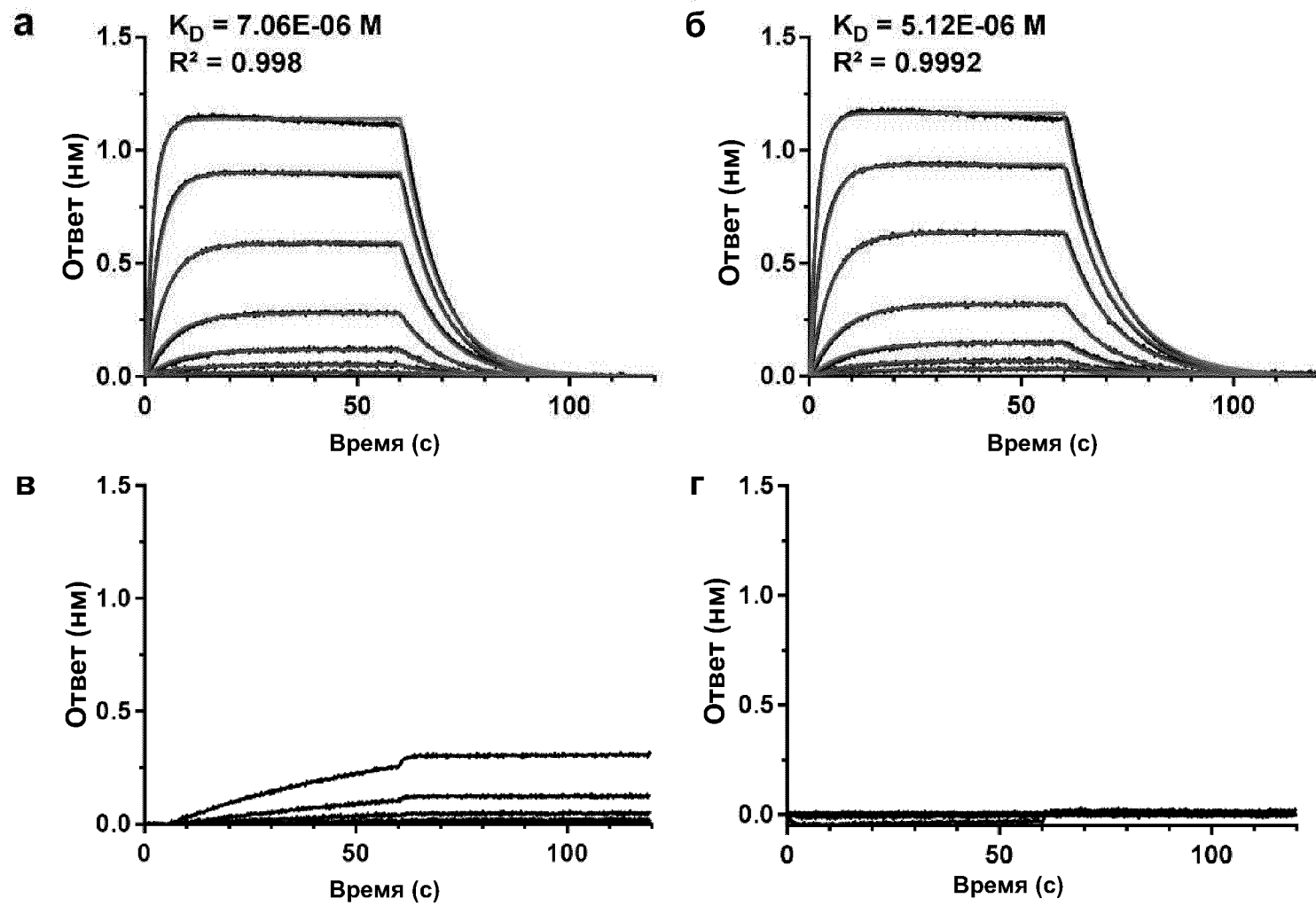
- (iv) одна аминокислота модифицирована в модуле $\beta 3$ бета-1 домена молекулы МНС II, а другая аминокислота в модуле $\alpha 3$ бета-1 домена молекулы МНС II, предпочтительно, в пределах модуля $\beta 3$ в пределах положений аминокислот 5 – 53, предпочтительно, в пределах положений аминокислот 17–41, более предпочтительно, в пределах положений аминокислот 21–28 и наиболее предпочтительно – в положении аминокислоты 26, и в пределах модуля $\alpha 3$ в пределах положений аминокислот 52–88, предпочтительно, в пределах положений аминокислот 66–76, более предпочтительно, в пределах положений аминокислот 65–80 и наиболее предпочтительно – в положении аминокислоты 75; и/или
 - (v) одна аминокислота модифицирована в модуле $\alpha 3$ бета-1 домена молекулы МНС II, а другая аминокислота в модуле $\alpha 1$ альфа-1 домена молекулы МНС II, предпочтительно, в пределах модуля $\alpha 3$ в пределах положений аминокислот 70–95, предпочтительно, в пределах положений аминокислот 74–94, предпочтительно, в пределах положений аминокислот 83–93, более предпочтительно, в пределах положений аминокислот 87–92 и наиболее предпочтительно – в положении аминокислоты 89, и в пределах модуля $\alpha 1$ в пределах положений аминокислот 50–70, более предпочтительно, в пределах положений аминокислот 50–60, более предпочтительно в пределах положений аминокислот 50–54 и наиболее предпочтительно – в положении аминокислоты 51.
19. Фармацевтическая композиция в соответствии с п. 17–18, дополнительно включающая одну или комбинацию нескольких костимуляторных молекул и/или хронологическую последовательность данных костимуляторных молекул, таких как, например, антитело к CD28 или антитело к 41BB.
20. Вакцина, включающая фармацевтическую композицию в соответствии с пп. 17–19.
21. Вакцина в соответствии с п. 20 для применения в производстве лекарственного препарата.

22. Вакцина в соответствии с пп. 20 или 21 для применения для предупреждения ракового заболевания, предпочтительно, за счет инициации у субъекта ответа Т-клеток.
23. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид в соответствии с любым из пп. 9–11.
24. Вектор, включающий по меньшей мере одну из молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с п. 23.

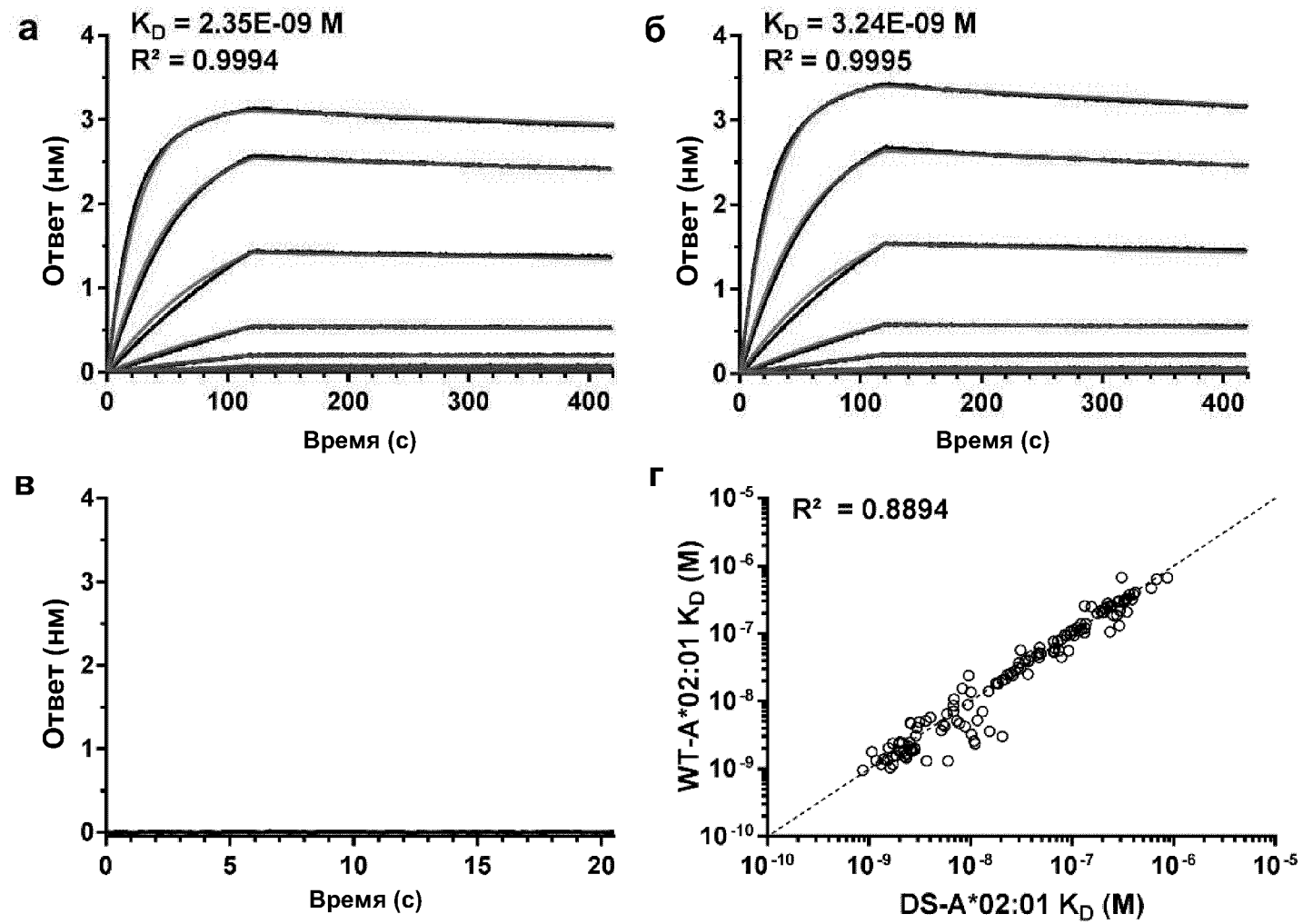
Фигура 1



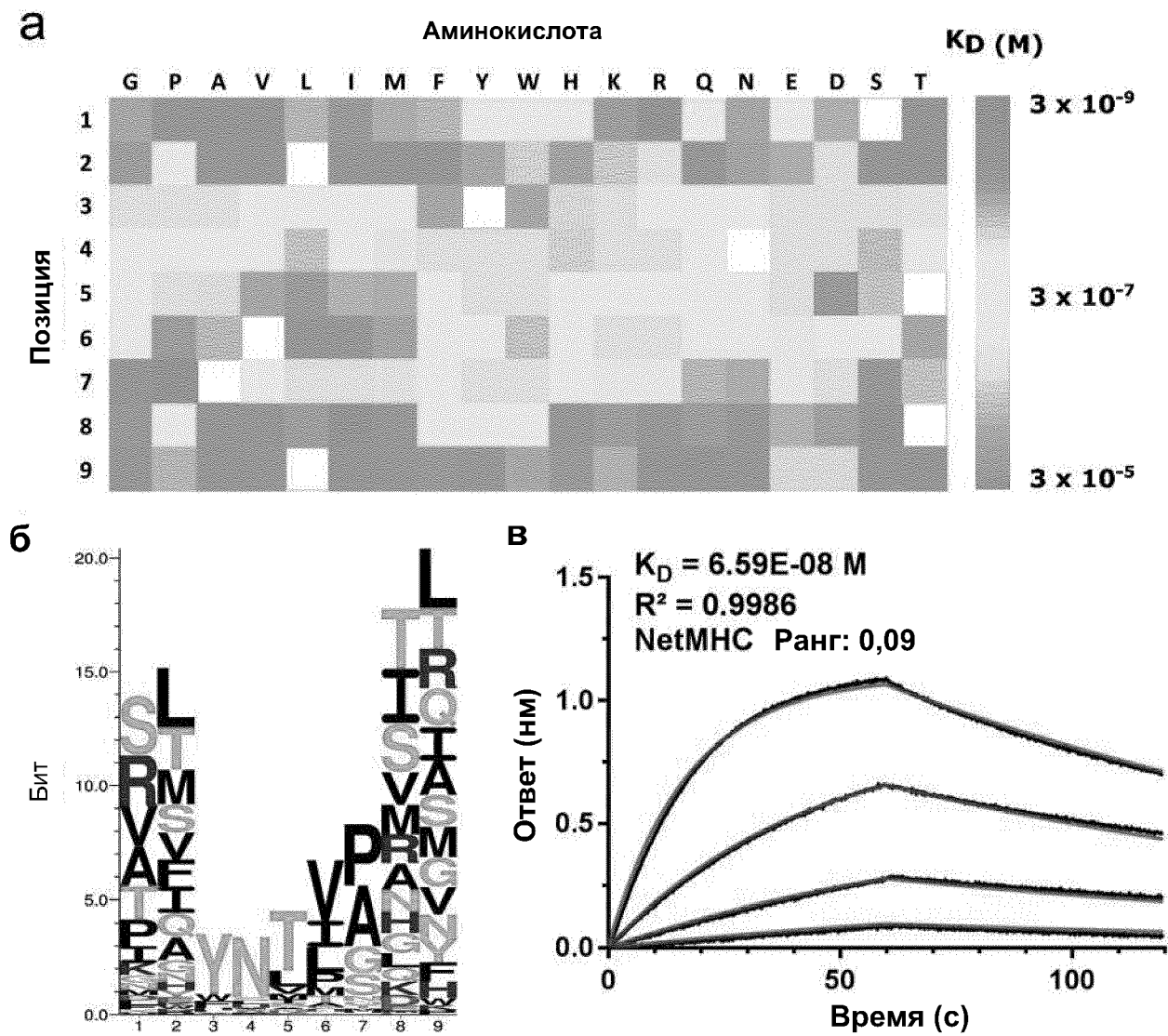
Фигура 2



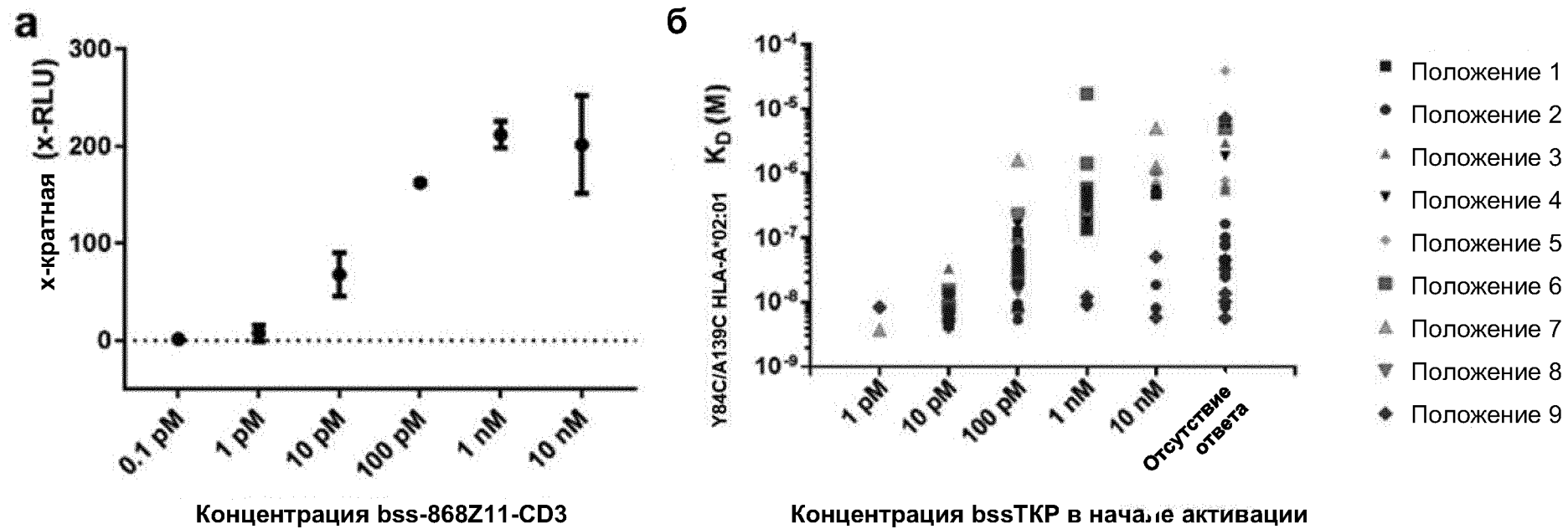
Фигура 3



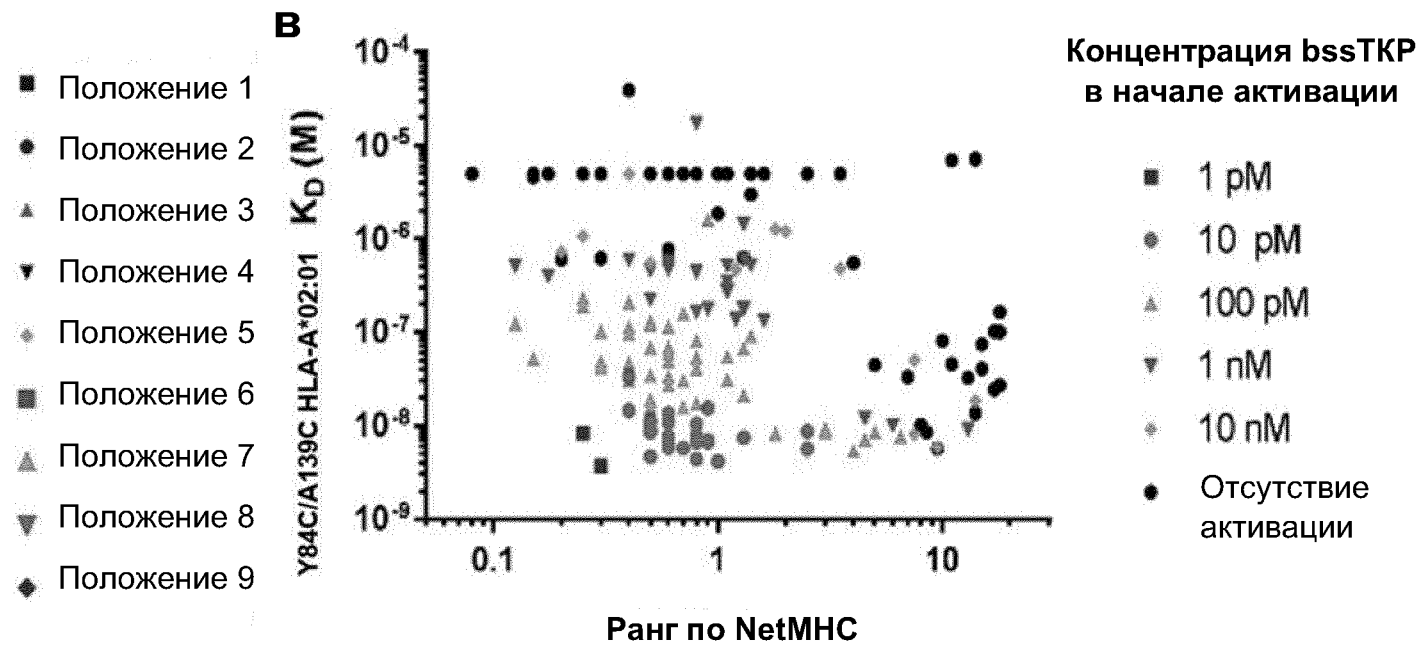
Фигура 4



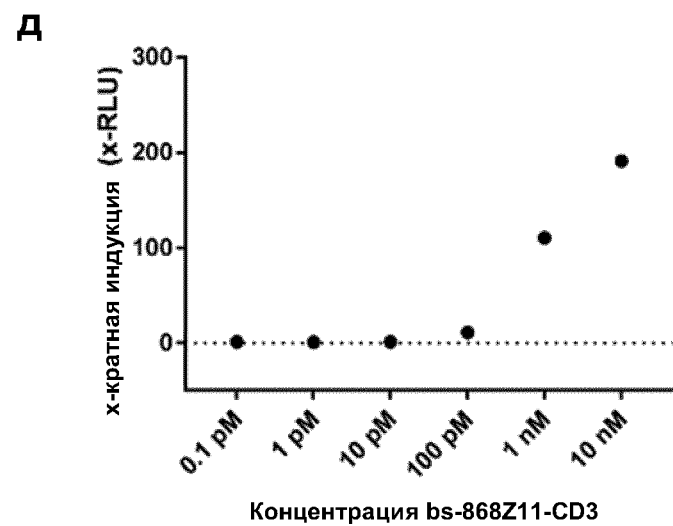
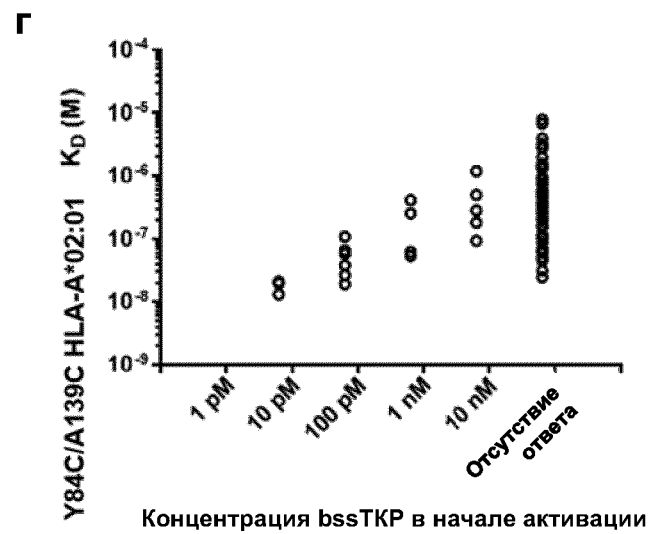
Фигура 5:



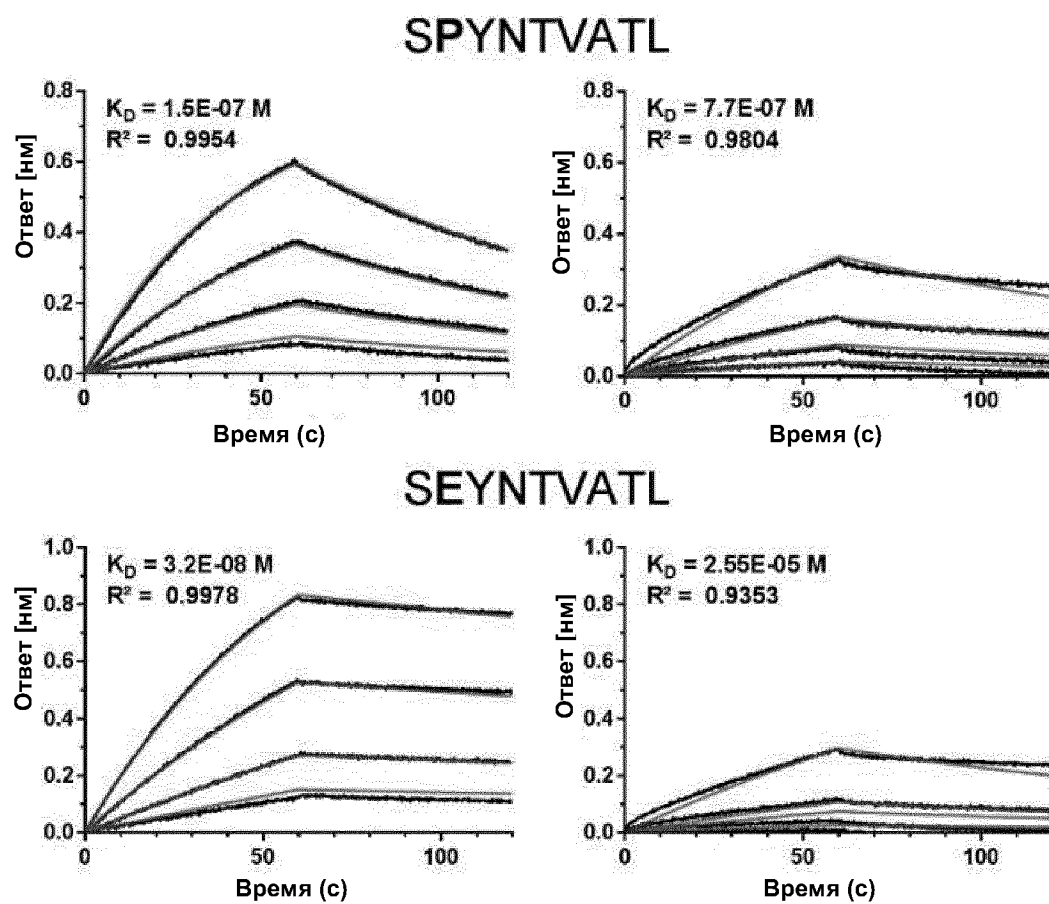
Фигура 5 (продолжение)



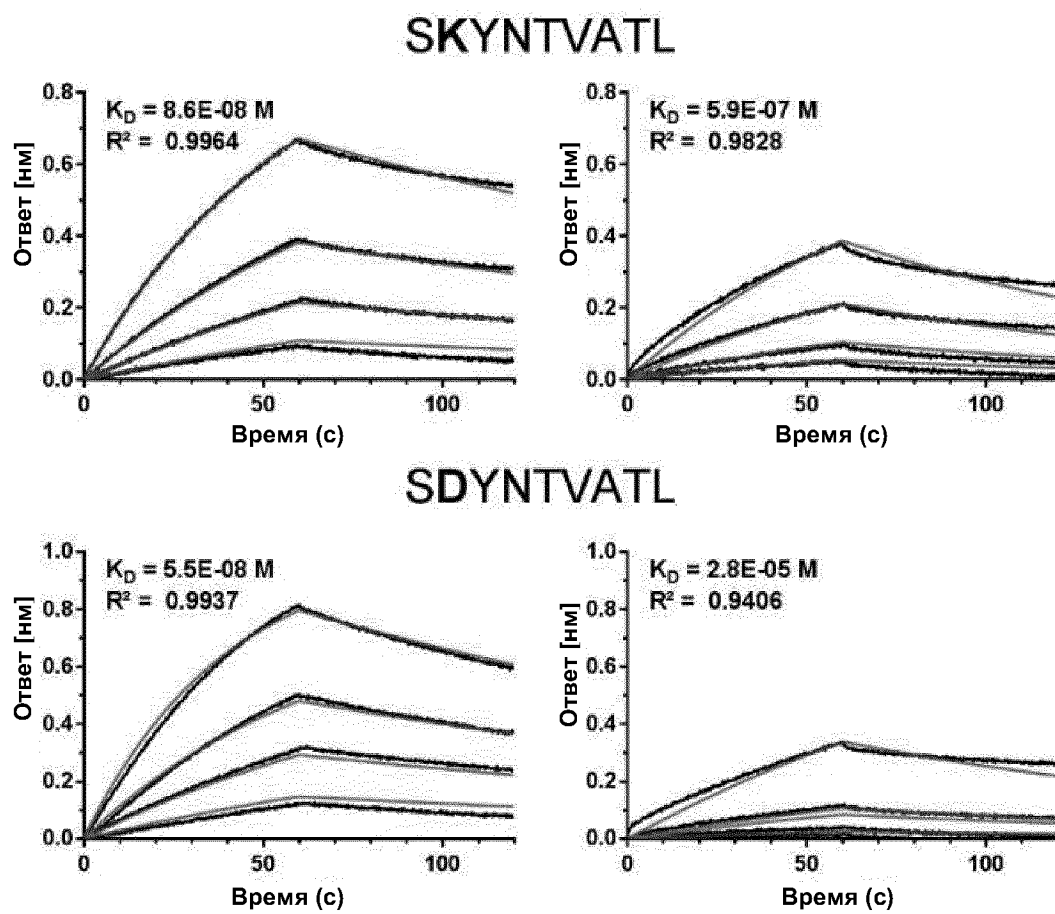
Фигура 5 (продолжение)



Фигура 6

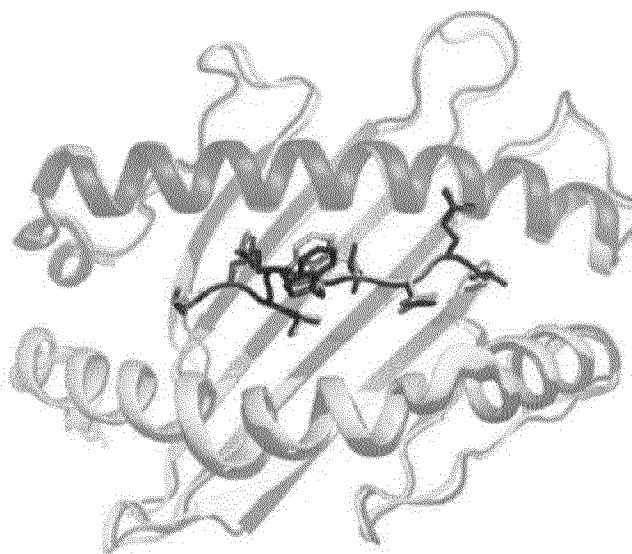


Фигура 6 (продолжение)

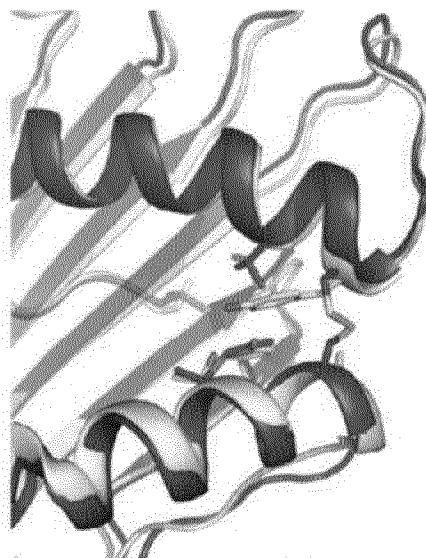


Фигура 7:

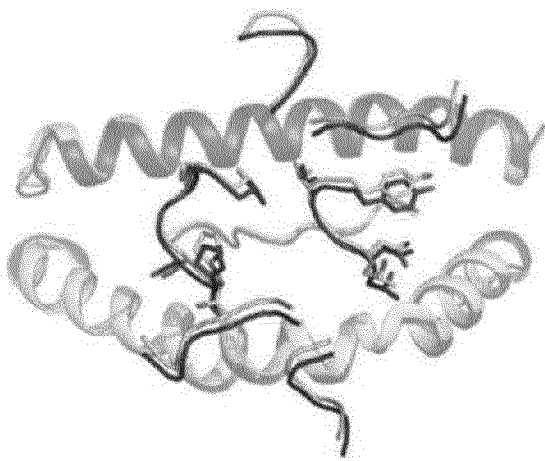
а



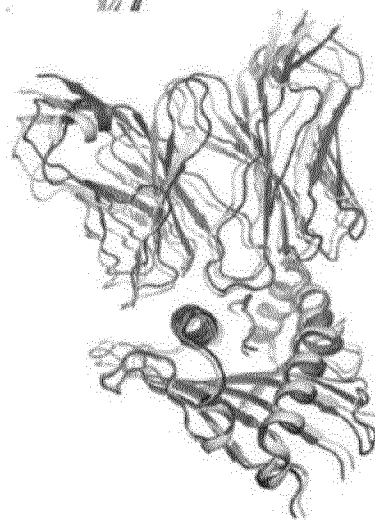
б



в



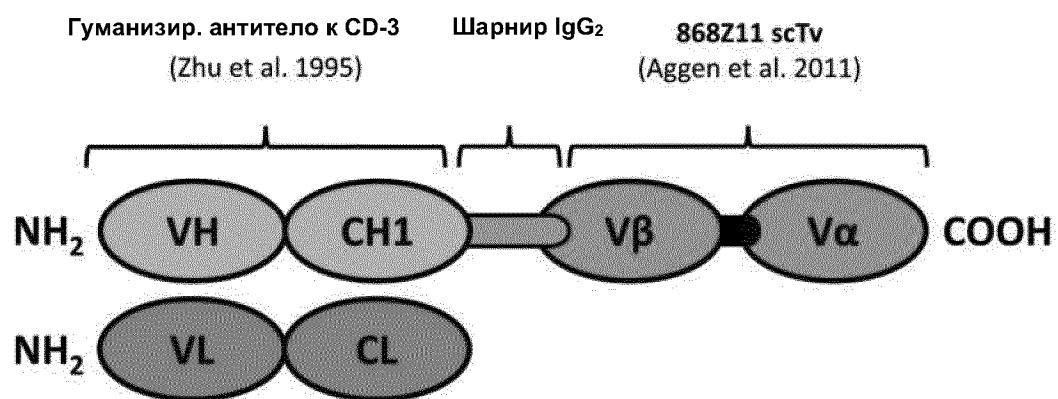
г



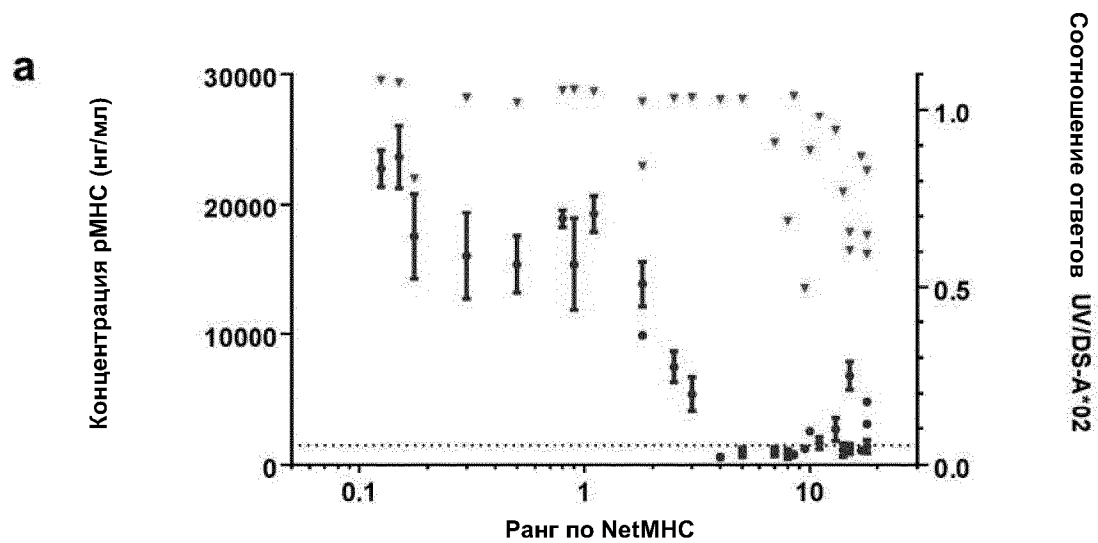
Фигура 8



Фигура 9



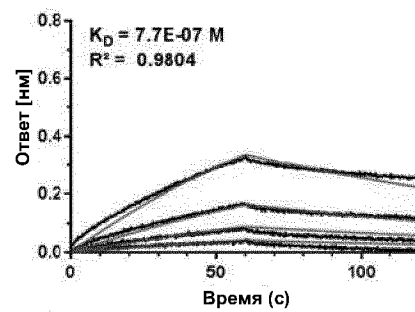
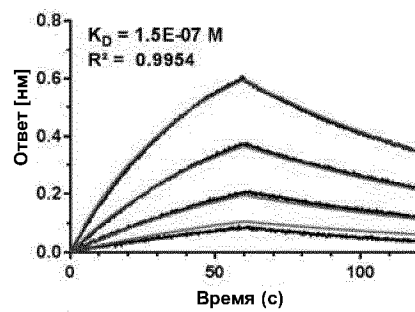
Фигура 10



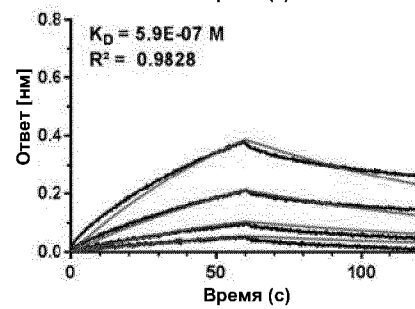
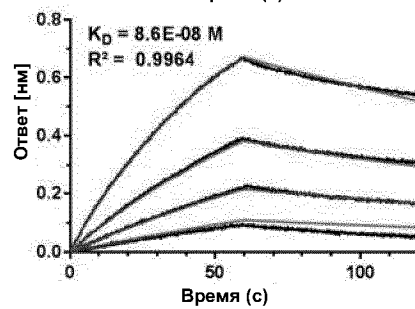
Фигура 10 (продолжение)

6

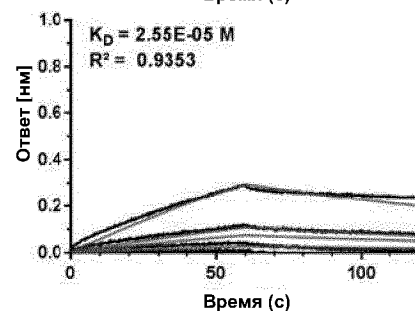
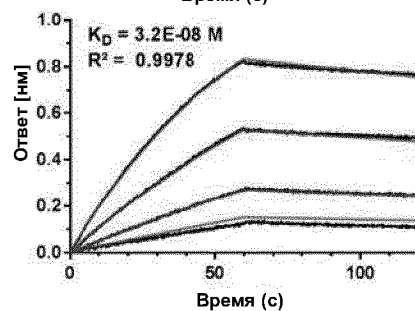
SPYNTVATL



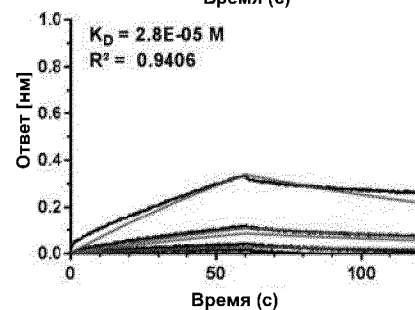
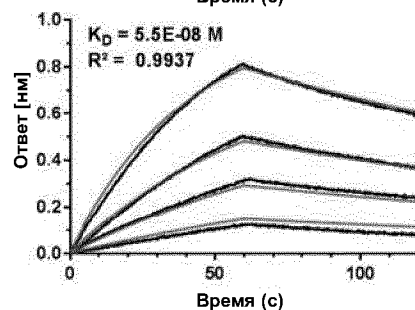
SEYNTVATL



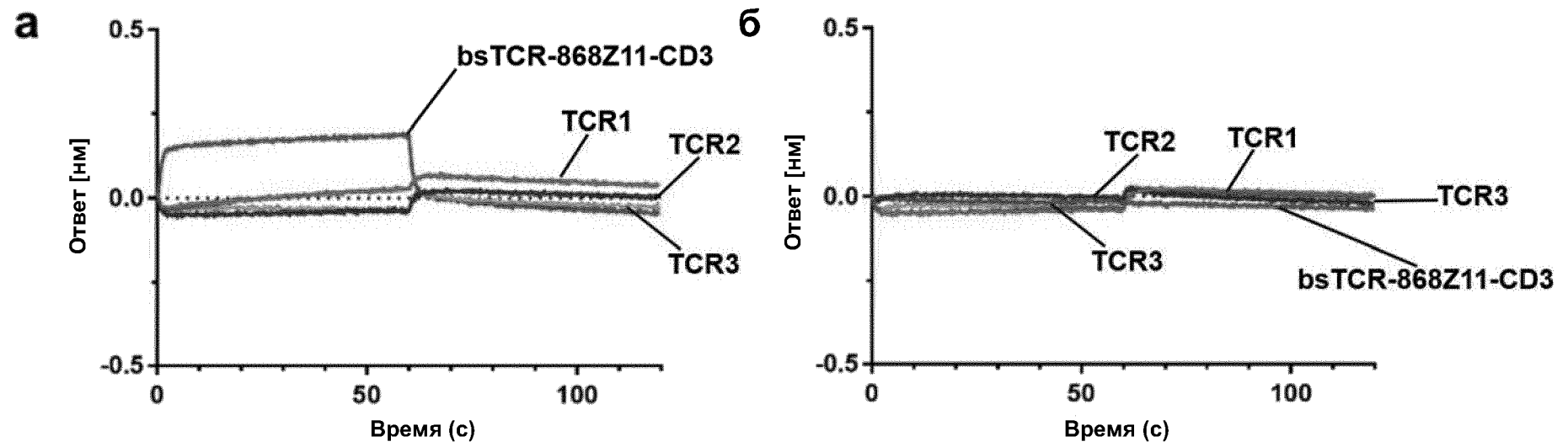
SKYNTVATL



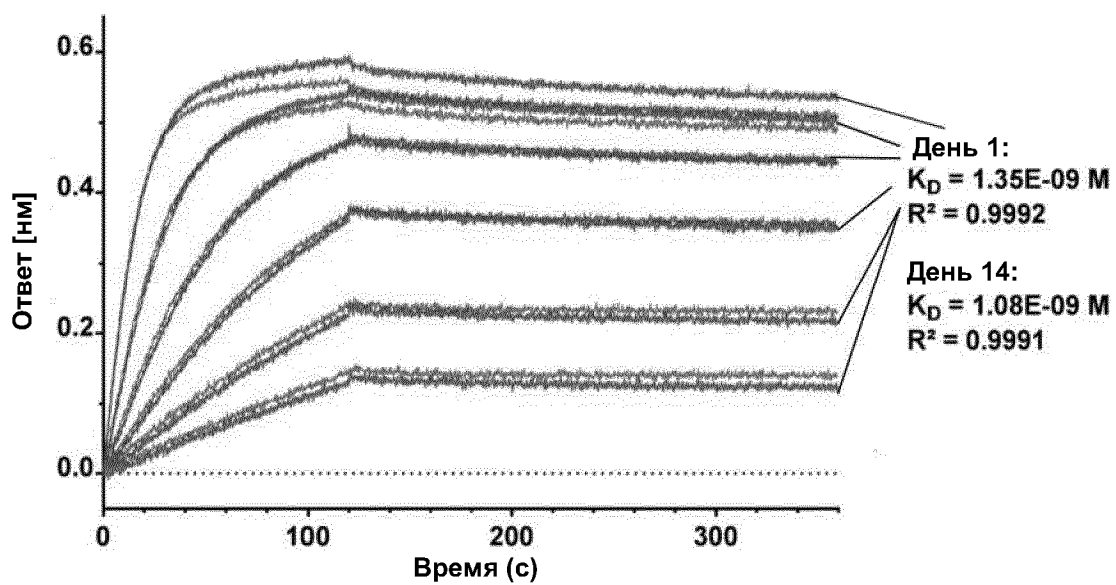
SDYNTVATL



Фигура 11



Фигура 12



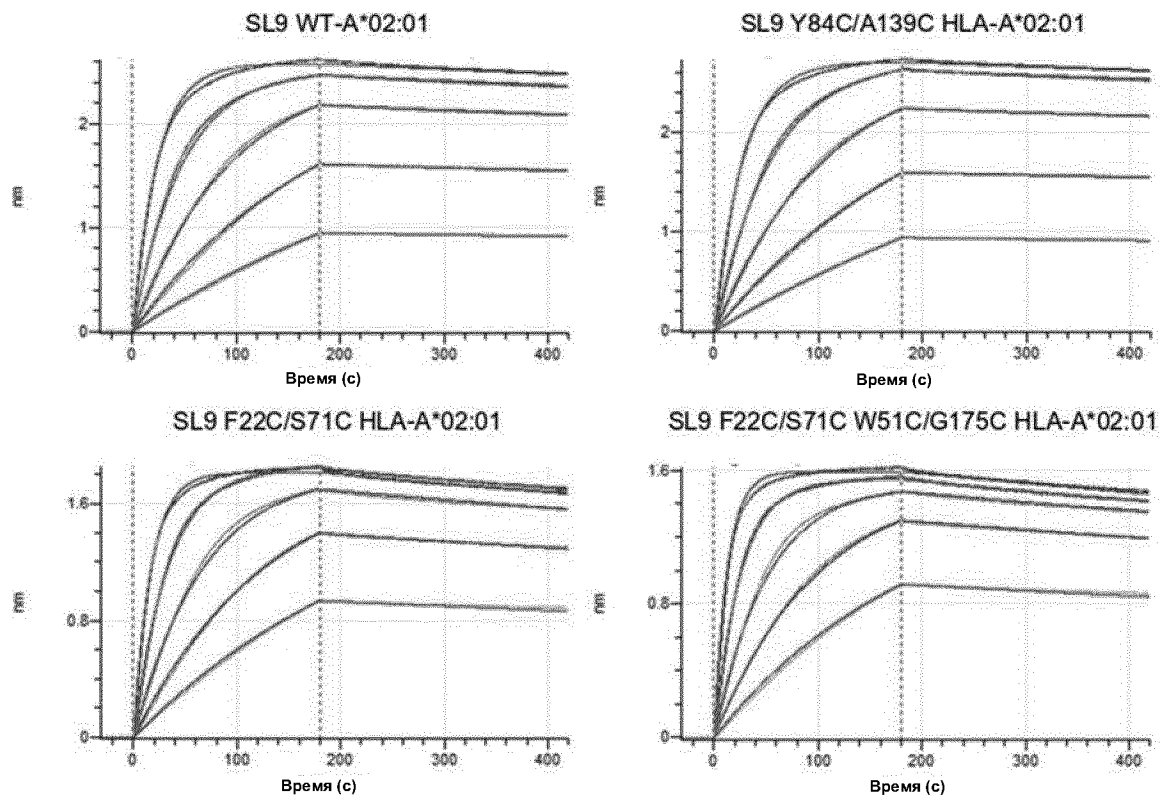
Фигура 13

HLA-L	GSHSLRYFSTAVSQPGRGEP RF IAVGYVDDTEFVRFDSDSVSPRMERRA PW VEQE----	55
HLA-J	-----A PTP *GISAPP FP -----GRAAGSPASLPWA IT TRSSCGST	36
HLA-K	-----V PTP *GISAPP CP -----GRVAGSPGTSQWA IT TRSSCGST	36
HLA-H	RSHSMRYFYTTMSRPGRGEP RF ISVGIVDDTQFVRFDSDAASQRMPEPRA PW MERE----	55
H2Kb	GPHSLRYFVTAVSRPGLGEP RY MEVGIVDDTEFVRFDSDAENPRYEPRAP PW MEQE----	55
HLA-E	GSHSLKYFHTSVSRPGRGEP RF ISVGIVDDTQFVRFDNDAASPRMVPRA PW MEQE----	55
HLA-F	GSHSLRYFSTAVSRPGRGEP RY IAVEYVDDTQFLRFDSDAAI PR MEPRE PW VEQE----	55
HLA-G	GSHSMRYFSAAVSRPGRGEP RF IAMGYVDDTQFVRFDSDSACPRMEPRA PW VEQE----	55
HLA-A	GSHSMRYFFTSVSRPGRGEP RF IAVGYVDDTQFVRFDSDAASQKMEPRA PW IEQE----	55
HLA-B	GSHSMRYFYTSVSRPGRGEP RF ISVGIVDDTQFVRFDSDAASPREEPRA PW IEQE----	55
HLA-C	CSHSMKYFFTSVSRPGRGEP RF ISVGIVDDTQFVRFDSDAASPRGEPRA PW VEQE----	55
	: * . *	
HLA-L	-----GLE Y WDQ E TRN-----AKGH AQ IYRV	76
HLA-J	VTP*V*G*RRGRGWSRRGRSIGTYRHWA PR PHRLTE*TCGPCSATTTRARRG IT SSRE	92
HLA-K	ATRRLRGCSRSRRGWSRRGRSIGTGAHGTS GP RTD*QE*TCPCRAATTTTRARP GL TPSR*	93
HLA-H	-----GPEYWD R NTQ I -----CKAQ AQ TERE	76
H2Kb	-----GPEYWER E TQ K -----AKG NEQ SFRV	76
HLA-E	-----GSEYWD R ETRS-----ARDT AQ IFRV	76
HLA-F	-----GPQYWE W TTGY-----AKAN AQ TDRV	76
HLA-G	-----GPEYWE E ETRN-----TKAH AQ TDRM	76
HLA-A	-----GPEYWDQ E TRN-----MKAH SQ TDRA	76
HLA-B	-----GPEYWD R NTQ I -----YKAQ AQ TDRE	76
HLA-C	-----GPEYWD R ETQ K -----YKRA AQ TDRV	76
	. * :	
HLA-L	NLRTLLR YY NQSEAGSHTIQRKHGCDVGPTGASSAGMNSSPTMARITSP*TRTCTPGPP-	134
HLA-J	CLAATW GPT GVSSAGMSSMPTT-----ARITSP*TRTCAPGPP-	129
HLA-K	CMAATW GK GASSAGMNSTPTM-----ARIT*PGTRTCAPGPR-	130
HLA-H	NLR IALRYY NQSEGGSH T MQVM-----YGCDVGPDG	107
H2Kb	DLRTLL GY NQSKGGSHTIQVI-----SGCEVGS D G	107
HLA-E	NLRTL RGYY NQSEAGSHTLQWM-----HGCELGPDR	107
HLA-F	ALRNLLR RY NQSEAGSHTLQGM-----NGCDMGPDG	107
HLA-G	NLQTL RGYY NQSEASSHTLQWM-----IGCDLGSDG	107
HLA-A	NLGLTL RGYY NQSE D GSHTIQIM-----YGC D VGPDG	107
HLA-B	SLRNLR GY NQSEAGSHTLQSM-----YGC D VGPDG	107
HLA-C	SLRNLR GY NQSEAGSHTLQWM-----CGCDLGPDG	107
	: . * . . :	
HLA-L	-----RTQRLR SF STSGKRTNTQSRSGPT*GQV--HGVA---	165
HLA-J	-----RIPRLRL SF SASMRP PM WLSKG E PTWRAPAWSGSAD--	164
HLA-K	-----RTWRLR SF SASGRQK NL QSRSGPTWRARAWRGSQT--	165
HLA-H	RFLRGYEQHAYDSKD Y IALNEDLRSWTAA DM AAQITKRKWEAARQAEQLRAYLEGEFVEW	167
H2Kb	RLLRGYQQYAYDGKD Y IALNEDLKTWTA ADM AALITKHKEQAGEAERL RAY LEGTCVEW	167
HLA-E	RFLRGYEQFAYDGKD Y IALNEDLRSWTAV DT AAQISEQKSNDASEAHQRAYLEDTCVEW	167
HLA-F	RLLRGYQHAYDGKD Y IALNEDLRSWTAA DT AAQITQRFYEAEEYAEFRTYLEGECLEL	167
HLA-G	RLLRGYEQYAYDGKD Y IALNEDLRSWTAA DT AAQISKRKCEAA NA VAEQRRAYLEGTCVEW	167
HLA-A	RFLRGYRQDAYDGKD Y IALNEDLRSWTAA DM AAQITKRKWEA VH AAEQRRVYLEGR CV DG	167
HLA-B	RLLRGHDQYAYDGKD Y IALNEDLRSWTAA DT AAQITQRKWEAAREAEQRRAYLEGE CV EW	167
HLA-C	RLLRGYDQYAYDGKD Y IALNEDLRSWTAA DT AAQITQRKWEAAREAEQRRAYLEGTCVEW	167
	: : . :	
HLA-L	PQTPGER EG DAAARGSPKGTCDPAPHL*P*GHPEVLGPGPLPCGDH----TDLAAGWGGP	219
HLA-J	---TWRT GRR RCSARTPPK----THV--THP-PL*T*GITRSWVLGFYPAEITLTWQ R D	211
HLA-K	---PGER EG DAAAHG PL PQ----THM--IHHSVSDYKATLRCWALGFY P VEITLAWQ Q D	215
HLA-H	LRRYLE NG KETLQ R ADPPK----THM--THHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQ R D	220
H2Kb	LRRYL KN G N ATLLRTDSPK----AHV--THHSRPEDK V LRCWALGFYPADITLTWQ L N	220
HLA-E	LHKYLE K GKETLLHLEPPK----THV--THHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQ Q D	220
HLA-F	LRRYLE NG KETLQ R ADPPK----AHV--AHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQ R D	220
HLA-G	LHRYLE NG K E MLQ R ADPPK----THV--THHPVFDYEATLRCWALGFYPAEITLTWQ R D	220
HLA-A	LRRYLE NG KETLQ R TDPK----THM--THHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQ R D	220
HLA-B	LRRYLE NG KDKLERADPPK----THV--THHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQ R D	220
HLA-C	LRRYLE NG KETLQ R AEHPK----THV--THHPVSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQ W D	220
	. * :	
HLA-L	DPGHGACGDQACRGRNLPEV-----GGCSGAFRRGAEIHVP-----CAA*GAARAP	264

Фигура 13 (продолжение)

HLA-J	G-----EDQTQDMELVET-----RPTGDGTFQKWAVVVVPSGEEQRYTCHVQHK-GLP	258
HLA-K	G-----EDQTRDMELLEET-----RPAGDGTfQKWAAVVVPSGEEQRYPCHVQHE-GLP	262
HLA-H	G-----EDQTHTRSSWRPGLQGMPSRSRGR--LWWCLLER-SRDTpAMCSMRVC-QSP	269
H2Kb	G-----EELIQDMELVET-----RPAGDGTfQKWASVVVPLGKEQYYTCHVYHQ-GLP	267
HLA-E	G-----EGHTQDTELVELT-----RPAGDGTfQKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHE-GLP	267
HLA-F	G-----EEQTQDTELVELT-----RPAGDGTfQKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHE-GLP	267
HLA-G	G-----EDQTQDVELVELT-----RPAGDGTfQKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHE-GLP	267
HLA-A	G-----EDQTQDTELVELT-----RPAGDGTfQKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHE-GLP	267
HLA-B	G-----EDQTQDTELVELT-----RPAGDRTfQKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHE-GLP	267
HLA-C	G-----EDQTQDTELVELT-----RPAGDGTfQKWAAVMVPSGEEQRYTCHVQHE-GLP	267
	. : : . . : *	
HLA-L	HPEMGAVFSAHH---PHRG--HRCWPVSPWSCGHWSCGCCDVVEEEKLR*NK-EELCSGC	317
HLA-J	KPLILRWEFSPQPTIPIVGIIAGLVLL-----GAV---VTG-	291
HLA-K	KPLTLRWEQSSQPTIPIVGIVAGLVLL-----GAV---VTG-	295
HLA-H	SP*DGSHLPS--PPSPSWASLLAWFYL*LWSLELWSLL*CGGRRAQIEKEGATLRLQAA-	323
H2Kb	EPLTLRWEPPPS-TVSNMATVAVLVVL-----GAA--IVTG-	300
HLA-E	EPVTLRWKSPQPTIPIVGIIAGLVLL-----GSV---VSG-	300
HLA-F	QPLILRWEQSPQPTIPIVGIVAGLVLL-----GAV---VTG-	300
HLA-G	EPLMLRWKQSSLPTIPIMGIVAGLVVL-----AAV---VTG-	300
HLA-A	KPLTLRWELSSQPTIPIVGIIAGLVLL-----GAV---ITG-	300
HLA-B	KPLTLRWEPPSSQSTVPIVGIVAGLAVL-----AVV---VIG-	300
HLA-C	EPLTLRWEPPSSQPTIPIVGIVAGLAVL-----AVL--AVLG-	301
	* . :	
HLA-L	LQQLCSVL*CIS*YL*SLX-----	333
HLA-J	--AVVTAVMW-RKKSSDRKGGSYSQAASSQSAQGSVDVSLTACKV*	332
HLA-K	--AVVSAVMC-RKKNSDRV--SYSEAASSDHAQGSVDVSLTACKV*	334
HLA-H	--TVPRALMCLSRRESVX-----	339
H2Kb	--AVVAFVMKMRRRNTGGKGGDYALAPG--SQTSDLSLPDCKA-	339
HLA-E	--AVVAAVIW-RKKSSGGKGGSYSKAEWSDSAQGSSESHSL-----	337
HLA-F	--AVVAAVMW-RKKSSDRNRGSYSQAAV-----	325
HLA-G	--AAVA AVLW-RKKSSD-----	314
HLA-A	--AVVAAVMW-RRKSSDRKGGSYTQAASSDSAQGSVDVSLTACKV-	341
HLA-B	--AVVAAVMC-RRKSSGGKGGSYSQAACSDSAQGSVDVSLTA----	338
HLA-C	--AVVAVVMC-RRKSSGGKGGSCSQAASSNSAQGSDESLIACKA-	342

Фигура 14



Идент. № образца	Ответ	KD (M)	Погрешн. KD	ка (1/Мс)	Погрешн. ка	kdis (1/с)	Погрешн. kdis
SL9 WT-A*02:01	2.6134	2.07E-09	2.13E-11	8.44E+04	1.12E+02	1.76E-04	1.79E-06
SL9 Y84C/A139C HLA-A*02:01	2.7347	1.99E-09	1.98E-11	7.27E+04	7.76E+01	1.45E-04	1.43E-06
SL9 F22C/S71C HLA-A*02:01	1.7982	2.74E-09	1.41E-11	1.25E+05	1.59E+02	3.42E-04	1.71E-06
SL9 F22C/S71C W51C/G175C HLA-A*02:01	1.6162	2.40E-09	1.30E-11	1.54E+05	2.26E+02	3.69E-04	1.93E-06

Фигура 15

