



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.09

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

(21) Номер заявки
202091015

(22) Дата подачи заявки
2018.10.22

(54) НОВЫЙ Т-КЛЕТОЧНЫЙ РЕЦЕПТОР

(31) 1717578.7; 1806155.6

(32) 2017.10.26; 2018.04.16

(33) GB

(43) 2020.07.17

(86) PCT/GB2018/053045

(87) WO 2019/081902 2019.05.02

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЮНИВЕРСИТИ КОЛЛИДЖ
КАРДИФФ КОНСАЛТЕНТС ЛТД
(GB)**

(72) Изобретатель:
Сьюэлл Эндрю, Долтон Гарри (GB)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) EUN JEONG WON ET AL.: "Clinical relevance of circulating mucosal-associated invariant T cell levels and their anti-cancer activity in patients with mucosal-associated cancer", ONCOTARGET, vol. 7, no. 46, 15 November 2016 (2016-11-15), XP055469874, United States ISSN: 1949-2553, DOI: 10.18632/oncotarget.11187, abstract, page 76281, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 1, page 76282; figure 6

SIDONIA B.G. ECKLE ET AL.: "A molecular basis underpinning the T cell receptor heterogeneity of mucosal-associated invariant T cells", THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 211, no. 8, 21 July 2014 (2014-07-21), pages 1585-1600, XP055539284, US, ISSN: 0022-1007, DOI: 10.1084/jem.20140484, abstract, page 1590; table 1

NICK GOLDFINCH ET AL.: "Conservation of mucosal associated invariant T (MAIT) cells and the MR1 restriction element in ruminants, and abundance of MAIT cells in spleen", VETERINARY RESEARCH, vol. 41, no. 5, 31 May 2010 (2010-05-31), page 62, XP055539295, NL ISSN: 0928-4249, DOI: 10.1051/vetres/2010034, abstract, page 9; figure 4

MARIELLE C. GOLD ET AL.: "MR1-restricted MAIT cells display ligand discrimination and pathogen selectivity through distinct T cell receptor usage", THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 211, no. 8, 21 July 2014 (2014-07-21), pages 1601-1610, XP055539298, US ISSN: 0022-1007, DOI: 10.1084/jem.20140507, abstract, page 1602; table 1, page 1608; figure 5

WO-A1-2018162563

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

Область техники

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

Предпосылки создания изобретения

Авторы настоящего изобретения открыли новый класс Т-клеток, эффективный для лечения рака, который распознает раковые клетки через родственный главному комплексу гистосовместимости, инвариантный в популяции белок (MR)1. Идентификация этой новой Т-клетки произошла в результате экспериментов по поиску Т-клеток, распознающих раковые клетки без необходимости в специфическом антигене лейкоцитов человека (HLA). Лocus HLA сильно варьирует, и сегодня было описано более 17000 различных аллелей. Поэтому любой терапевтический подход, который работает через HLA, может быть эффективен только у меньшинства пациентов. Напротив, вся популяция людей экспрессирует MR1.

Известный основной тип рестриктированных по MR1 Т-клеток называется ассоциированными со слизистой оболочкой, инвариантными Т-клетками (MAIT). Известно, что MAIT распознают промежуточные продукты биосинтеза рибофлавина микобактериями. Недавние исследования, проведенные авторами настоящего изобретения и другими лабораториями, показали, что существуют также другие типы MR1-рестриктированных Т-клеток, которые распознают отличные лиганды, связанные с MR1. Представленный здесь труд показывает, что новый класс Т-клеток обладает специфичностью к мишени через MR1, но TCR не связывается с MR1 как таковым или с MR1, нагруженным известными инфекционными лигандами, скорее эта Т-клетка распознает специфический для рака лиганд в связывающем желобке MR1; MR1 представляет собой специфический для рака или активируемый на этапе экспрессии раком лиганд для TCR.

Новый клон Т-клеток, MC.7.G5, был открыт авторами настоящего изобретения во время скрининга Т-клеток от здорового донора, у которого HLA не соответствовал линии клеток альвеолярного эпителия базальной мембраны аденокарциномы, A549 (номер в ATCC® - CCL-185 для информации). Экспериментальный подход включал инкубацию Т-клеток с клетками A549, затем выделение и клонирование Т-клеток, которые пролиферировали в ответ на клетки A549. Дальнейшие исследования показали, что Т-клеточный клон MC.7.G5 был способен распознавать и уничтожать раковые клетки, а сверх того, раковые клетки из ряда органов и типов тканей, таким образом показывая, что клон потенциально способен к лечению большинства типов рака.

Как известно и показано на фиг. 12, TCR представляет собой связанный дисульфидными связями, закрепленный в мембране гетеродимерный белок, обычно состоящий из сильно переменных альфа (α) и бета (β) цепей, которые связываются с инвариантными молекулами CD3-цепи с образованием полностью функционирующего TCR. Т-клетки, экспрессирующие этот рецептор, называют $\alpha\beta$ (или $\alpha\beta$) Т-клетками.

α - и β -цепи состоят из экстраклеточных доменов, содержащих константную (C) область и переменную (V) область. Константная область является проксимальной к клеточной мембране, за ней следуют трансмембранная область и короткий цитоплазматический хвост, в то время как переменная область связывается с лигандом. Лиганд для большинства $\alpha\beta$ Т-клеток представляет собой пептид, связанный с молекулой MHC.

Каждый переменный домен и α -цепи, и β -цепи TCR имеет три переменных участка, называемых определяющими комплементарность участками (CDR). Существует также дополнительная область переменности β -цепи (HV4), которая обычно не связывается с антигеном и поэтому не считается CDR. Как правило, антигенсвязывающий сайт образован петлями CDR α -цепи и β -цепи TCR. CDR1 α и CDR2 α кодируются отдельными генами V α , тогда как CDR1 β и CDR2 β кодируются отдельными генами V β . CDR3 α -цепи TCR является гиперпеременной из-за возможности добавления и удаления нуклеотидов вокруг места соединения V-области и соединительной области (J-области). CDR3 β -цепи TCR обладает еще большей способностью к вариации, поскольку он также может включать ген разнообразия (D).

CDR3 является основным CDR, ответственным за распознавание процессированного антигена, хотя было также установлено, что CDR1 альфа-цепи взаимодействует с N-концевой частью антигенного пептида, а CDR1 β -цепи взаимодействует с C-концевой частью пептида.

В 2015 г. приблизительно 90,5 млн человек страдали раком. Приблизительно 14,1 млн новых случаев происходят в год (не считая рака кожи, кроме меланомы). Он приводит к приблизительно 8,8 млн

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

Т-клетки, которые идентифицированы здесь авторами настоящего изобретения, обладают вышеуказанными преимущественными характеристиками, поскольку они эффективны против любого типа рака, и они не рестриктированы по МНС, а значит, применимы для всей популяции из-за повсеместной экспрессии молекулы рестрикции MR1.

Заявления об изобретении

В соответствии с первым аспектом настоящего изобретения предоставляется опухолеспецифический Т-клеточный рецептор (TCR), характеризующийся определяющим комплементарность участком, включающим или состоящим из (CDR) CAYRSVAVNARLMF (SEQ ID NO:1) и/или CASSEARGLAFTDTQYF (SEQ ID NO: 2).

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

Описанные здесь CDR представляют собой CDR3 указанного TCR и, следовательно, являются основными CDR, ответственными за распознавание процессированного антигена или лиганда. Другие CDR (CDR1-альфа, CDR2-альфа, CDR1-бета и CDR2-бета) кодируются зародышевой линией. Следовательно, настоящее изобретение, кроме того, касается TCR, также включающего один или более из этих других CDR, т.е. CDR1-альфа, CDR2-альфа, CDR1-бета или CDR2-бета.

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

TSESDYY (CDR1 α) SEQ ID NO: 3

ATEN (CDR2 α) SEQ ID NO: 4

MGHDK (CDR1 β) SEQ ID NO: 5

SYGVNS (CDR2 β) SEQ ID NO: 6

Ссылка здесь на опухолеспецифический TCR относится к TCR, который специфически распознает опухолевую клетку или лиганд опухолевой клетки, в связи с MR1, и активируется тем же, но не активируется неопухолевой клеткой или лигандом неопухолевой клетки, в связи с MR1.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный TCR представляет собой $\alpha\beta$ TCR, имеющий α -цепь и β -цепь, и указанный CDR указанной α -цепи включает или состоит из CDR: CAYRSVAVNARLMF (SEQ ID NO: 1) или CDR, который идентичен ему на по крайней мере 88%, например 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%; а указанный CDR указанной β -цепи включает или состоит из CASSEARGLAFTDTQYF (SEQ ID NO: 2) или CDR, который идентичен ему на по крайней мере 88%, например 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%. Соответственно, указанный TCR может содержать один или оба из вышеупомянутых CDR, а в предпочтительном варианте осуществления содержит оба из указанных CDR.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления указанный TCR является необычным в том смысле, что он не рестриктирован по МНС, точнее он связывается с опухолеспецифическим лигандом в связи с MR1, альтернативной МНС-подобной молекулой. До сих пор считалось, что MR1-рестриктированные $\alpha\beta$ Т-клетки были исключительно ассоциированными со слизистой оболочкой инва-

риантными Т-клетками (MAIT-клетками), однако здесь авторы настоящего изобретения демонстрируют, что существует еще один класс MR1-рестриктированных Т-клеток, которые не экспрессируют α -цепь TCR MAIT; более того, преимущественно эти Т-клетки и их TCR являются опухолеспецифическими (т.е. реагируют на опухолевые клетки, но не на неопухолевые клетки), но, что удивительно, способны идентифицировать любую опухоль независимо от происхождения или типа ткани, а значит, обладают возможностью лечить любой рак. Кроме того, тот факт, что эти Т-клетки и их TCR не рестриктированы по MHC, означает, что они обладают возможностью лечить всю популяцию, а значит, представляют собой чрезвычайно важную новую противораковую терапию.

В дальнейшем предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанная α -цепь TCR включает или состоит из:

AQTVTQSQPEMSVQEAETVTLSCTYD**TSESDYYL**FWYKQPPSRQMILVIRQEAYKQQNA
TENRFSVNFQKA AKSFSLSKISDSQLGDAAMYF**CAYRSAVNARLMF**GDGTQLVVKPNIQ
 NPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDFKNSNA
 VAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFSPSPSS (SEQ ID NO:7)

или последовательности, которая идентична ей на по крайней мере 88%, например 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%.

В дальнейшем предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанная β -цепь TCR включает или состоит из:

EADYQTPRYLVIGTGKKITLCSQT**MGHDK**MYWYQQDPGMELHLIN**SYGVNST**EKG
 DLSSESTVSRIETEHPLTLESARPSHTSQYL**CASSEARGLAFTDTQYF**GPGTRLTVLED
 LKNVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPHVELSWVNGKEVHSGVCTDPQ
 PLKEQPALNDSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVI
 VSAEAWGRAD (SEQ ID NO:8)

или последовательности, которая идентична ей на по крайней мере 88%, например 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%.

В вышеприведенных абзацах жирный и подчеркнутый текст представляет собой CDR.

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

В еще одном предпочтительном варианте осуществления указанный TCR представляет собой растворимый TCR или sTCR, а значит в нем отсутствуют трансмембранный домен и, в идеале, также внутриклеточный домен.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный TCR является частью химерного рецептора, обладающего описанной здесь функциональностью.

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

В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения предоставляется клон Т-клеток, экспрессирующий указанный TCR по настоящему изобретению, в идеале, или в растворимой, или мембранно-сочетаемой форме, т.е. имеющий трансмембранную область и внутриклеточную область. Предпочтительно, когда указанный клон представляет собой клон MC.7.G5, описанный здесь.

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

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

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

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

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

В идеале указанный рак относится к любому типу, но в особенности к колоректальному раку, раку легкого, почки, предстательной железы, мочевого пузыря, шейки матки, меланоме (раку кожи), раку кости, молочной железы, яичника или крови.

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

Ссылка здесь на биспецифическое средство является ссылкой на биспецифическое моноклональное антитело (BsMAb, BsAb), которое представляет собой искусственный белок, который может одновре-

менно связываться с двумя различными типами антигена.

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

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

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

- а) указанный TCR, или клетку, или клон или вектор в комбинации с
- б) дополнительным противораковым терапевтическим средством.

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

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

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

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

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

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

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

фиг. 1 показывает, каким образом был выделен MC.7.G5, и его начальную характеристику. А. Т-клетки метили красителем CFSE и инкубировали в течение 2 недель с A549. Снижение флуоресценции CFSE представляло те Т-клетки, которые пролиферировали, что позволило выделить реагирующие на A549 Т-клетки. В. Реактивности MC.7.G5 на клетки A549, на основе высвобождения TNF α , не препятствовали блокирующим антителами против МНС класса I или II. Супернатанты от анализов собирали для анализа с помощью TNF α -специфического ELISA. С. Панель фенотипирования с помощью антител к MC.7.G5 показала, что он представляет собой $\gamma\delta$ - $\alpha\beta$ + CD8+ (с повтором на фиг. 16А).

На фиг. 2 показано, что MC.7.G5 не реагирует на нормальные (не раковые) клетки. В эксперименте сравнивается высвобождение TNF α из клона MC.7.G5 в ответ на линию клеток меланомы MM909.24 (рак-мишень для MC.7.G5) и четыре первичные (неопухолевые, неиммортизированные) линии клеток. SMC3 является линией гладкомышечных клеток; CIL-1 представляет собой реснитчатую эпителиальную клетку, MCR5 представляет собой линию клеток фибробластов, трансдуцированных hTERT; Hep2 является линией клеток гепатоцитов (линии нормальных клеток также протестированы на фиг. 15 и 17).

На фиг. 3 показана последовательность α - и β -цепей TCR MC.7.G5.

На фиг. 4 показано, что клон MC.7.G5 реагирует на широкий ряд опухолей-мишеней. Супернатанты собирали из анализа активации Т-клеток, показывающего ответную реакцию MC.7.G5 на ряд опухолей, и исследовали на продукцию TNF α и MIP1 β .

В. Анализ высвобождения хрома, показывающий специфическое уничтожение раковых клеток при указанных соотношениях Т-клеток и раковых клеток.

А & В выполнялись в двух повторах с планками погрешностей.

На фиг. 5 продемонстрировано введение вставок/делеций в гены при подходе к функциональному скринингу всего генома с использованием системы CRISPR, использованном для идентификации MR1 в качестве лиганда клона MC.7.G5. Данные скрининга полученной с использованием CRISPR библиотеки

клона MC.7.G5 показаны на фиг. 13.

На фиг. 6 показано, что клон MC.7.G5 демонстрирует специфичность к мишени с помощью MR1. А. Антитело против MR1 препятствовало распознаванию клеток A549. Продукция $\text{TNF}\alpha$ и $\text{MIP1}\beta$ в соответствии ELISA. В. MC.7.G5 распознавал нокауты MR1 (с помощью технологии CRISPR/Cas9) в A549c9 и меланоме MM909.24c4. С. Не было специфического уничтожения нокаутированных по MR1 клеток A549c9 или линии первичных клеток MRC5. Также показано уничтожение MM909.24wt и A549wt. D. Сверхэкспрессия MR1 в этой линии клеток в результате трансдукции лентивирусом слегка усиливает распознавание. Линия LCL pt146 не распознается клоном MC.7.G5, даже когда она была трансдуцирована для сверхэкспрессии MR1. Часть этого MR1 представлена на поверхности клетки и может быть обнаружена с помощью антитела против MR1 (справа).

На фиг. 7 показано, что клон MC.7.G5 не окрашивается тетрамерными формами лиганда для MAIT MR1-5-(2-оксопропилиденамино)-6-d-рибителиаминоурацилом (MR1-5-OP-RU) или MR1-ацетил-6-формилптеринном (Ac-6-FP). В параллельных экспериментах клон MAIT хорошо окрашивался тетрамером MR1-5-OP-RU. Существует также небольшая популяция клеток, которые окрашиваются MR1-5-OP-RU, в популяции PBMC. Ожидается, что в образцах PBMC будут обнаруживаемые MAIT-клетки. Этот результат показывает, что TCR MC.7.G5 не связывается с MR1 как таковым или с MR1, нагруженным известными инфекционными лигандами, и выдвигает в качестве предположения, что эта Т-клетка распознает специфический для рака лиганд в связывающем желобке MR1. Эксперименты с повторным окрашиванием тетрамером представлены на фиг. 14Е, включая эксперименты с "пустым" тетрамером MR1).

Фиг. 8 показывает, что Ac-6-FP и обусловленная M. smeg инфекция ослабляет распознавание клоном MC.7.G5, несмотря на усиление экспрессии MR1 на поверхности клетки. Инкубация клеток A549 или MM909.24 с 50 мкг/мл Ac-6-FP в течение 12 часов увеличивает экспрессию MR1 на поверхности, но ослабляет распознавание клоном MC.7.G5. Эффекты инфекции, обусловленной M. smeg, еще более драматичны и существенно уменьшают ответную реакцию клона MC.7.G5, действуя в качестве мощного активатора клона MAIT. Повторные эксперименты с M. smeg и Ac-6-FP представлены на фиг. 14F & G.

Фиг. 9 показывает, что трансдукция поликлональных Т-клеток с использованием TCR MC.7.G5 (как показано на фиг. 2) обеспечивает распознавание опухоли. Дальнейшие эксперименты с TCR MC.7.G5 и Т-клетками пациента представлены на фиг. 15.

Фиг. 10 представляет собой схему, показывающую, что TCR клона MC.7.G5 распознает только раковые клетки. Распознавание требует MR1 и ингибируется известными нераковыми лигандами MR1, что позволяет предположить, что MR1 представляет специфический для рака или активируемый на этапе экспрессии раком лиганд для TCR MC.7.G5;

Фиг. 11 представляет собой схему, показывающую, что известные лиганды MR1 ингибируют распознавание раковых клеток с помощью TCR MC.7.G5;

Фиг. 12 демонстрирует структуру мРНК и белка Т-клеточного рецептора. Структуры мРНК (наверху) показывают, что для каждой цепи CDR1 и CDR2 кодируются в зародышевой линии. CDR3 является продуктом множественности J-сегментов в соединениях V-J цепи α -цепи Т-клеточного рецептора (TCR) и соединениях V-D-J в β -цепи TCR. Следовательно, CDR3 является гипервариабельным. Цветная маркировка, принятая для петель CDR, сохраняется на протяжении всей фигуры. Области, окрашенные серым цветом, представляют константные и вариабельные домены TCR (не включая гипервариабельные петли CDR). На нижней панели показано ожидаемое свертывание белка. TCR принимают аналогичные третичные структуры, которые располагают петли определяющих комплементарность участков (CDR) на дистальном от мембраны конце молекул. Вместе шесть петель CDR образуют антигенсвязывающий сайт.

Фиг. 13. Скрининг охватывающей весь геном библиотеки CRISPR-Cas9 выявляет MR1 в качестве кандидата-мишени для MC.7.G5. (А) Обзор подхода, использованного для выявления лиганда MC.7.G5. Охватывающие весь геном MC.7.G5 GeCKO v2 библиотеки CRISPR-Cas9 (А и В) использовали в виде лентивируса для трансдукции линии клеток-мишеней HEK293T. MC.7.G5 лизировали HEK293T, экспрессирующие sgRNA, нацеленные на гены, которые не имеют отношения к распознаванию HEK293T, тем самым обогащая sgRNA, нацеленные на гены, которые необходимы для лизиса раковых клеток с помощью MC.7.G5. Были проведены два цикла селекции с использованием MC.7.G5, и подвергнутые селекции библиотеки сравнили с не подвергнутыми селекции HEK293T (без MC.7.G5) для выявления обогащенных sgRNA. (В) Распознавание с помощью MC.7.G5 отобранной библиотеки HEK293T после селекции значительно ослаблено по сравнению с HEK293T дикого типа, что позволяет предположить, что основные гены были удалены с помощью подхода к функциональному скринингу всего генома с использованием системы CRISPR/Cas9. Активация в течение ночи и TNF-специфический ELISA. (С) MR1 был идентифицирован как один из основных генов для распознавания с помощью MC.7.G5 HEK293T. Анализ MAGECK и выделенные (окрашенные) гены, sgRNA для которых были обогащены ≥ 2 sgRNA в отобранных клетках HEK293T. Валидация MR1 в качестве мишени для MC.7.G5 представлены на фиг. 14.

Фиг. 14. Валидация и исследование распознавания MR1 с помощью MC.7.G5. (А-Д) MR1 является экспрессируемой раковыми клетками мишенью MC.7.G5. (А) Распознавание меланомы MM909.24 было

ослаблено в присутствии блокирующего MR1 антитела. Антитела против MHCI и II использовали в качестве отрицательного контроля. Активация в течение ночи и TNF-специфический ELISA. (B) Устранение экспрессии MR1 из линий раковых клеток предотвращало опосредованное MC.7.G5 распознавание и уничтожение. Клетки меланомы MM909.24 и аденокарциномы легкого A549 трансдуцировали sgRNA для нокаута (-/-) гена MR1 с помощью CRISPRCas9. Активация в течение ночи и TNF-специфический ELISA. Анализ цитотоксичности на основе высвобождения хрома в течение 6 ч (MM909.24) или 18 ч (A549). (C) Сверхэкспрессия (+) MR1 увеличивала уничтожение раковых клеток с помощью MC.7.G5. Линии раковых клеток C1R и HeLa, которые, как было показано, вызывают относительно низкую активацию MC.7.G5, были трансдуцированы лентивирусом для стабильной сверхэкспрессии MR1. Меланома MM909.24 была включена в качестве положительного контроля. Анализ цитотоксичности на основе высвобождения хрома проводили в течение 6 ч. (D) Экспрессия MR1 в MR1-/- клетках восстанавливает активацию MC.7.G5. Клетки A549 дикого типа, MR1-/- и MR1-/- с трансгеном MR1 (+) использовали в анализе активации в течение ночи с MC.7.G5. TNF-специфический ELISA. (E&F) MC.7.G5 не распознает MR1 с помощью известных механизмов: (E) клон MC.7.G5, канонический MAIT клон (распознает MR1 со связанным 5-OP-RU) и MHCI-рестриктированный клон (MEL5/13, HLA A2-рестриктированный, распознающий пептид из Melan A: ELAGIGILTV) использовали для окрашивания следующими тетрамерами: "пустым" тетрамером MR1 (с мутацией K43A для обеспечения возможности рефолдинга в отсутствие лиганда MR1), тетрамерами MR1 5-OP-RU и MHCI (HLA A2 ELAGIGILTV). MHCI-рестриктированный клон использовали в качестве положительного контроля для нерелевантного тетрамера MHCI. (F) A549, нагруженные MAIT-активирующей бактерией *Mycobacterium smegmatis*, уменьшали распознавание A549 с помощью MC.7.G5. Канонический MAIT клон из E использовали в качестве положительного контроля. A549 MR1-/- использовали в качестве отрицательного контроля для обоих клонов. Окрашивание на CD107a на поверхности и внутриклеточный TNF. Дискриминационное окно устанавливалось только на клон. (G) Экзогенный Ac-6-FP, известная MR1-связывающая молекула, ослаблял распознавание с помощью MC.7.G5 меланомы MM909.24. Псевдообработанные WT и обработанные Ac-6-FP MR1-/- мишени использовали в качестве контролей. Левая панель: окрашивание на внутриклеточный CD107a, TNF и IFN γ в случае тройной позитивностью анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo. Планки погрешностей меньше, чем графические символы, представляющие два эксперимента. Правая панель: экспрессия MR1 в обработанных Ac-6-FP клетках-мишенях.

Фиг. 15. Перенос Т-клеточного рецептора MC.7.G5 перенаправляет Т-клетки пациента на уничтожение аутологичной меланомы. (A) Т-клетки от пациентов с метастатической меланомой (MM909.11 и MM909.24), трансдуцированные Т-клеточным рецептором MC.7.G5, распознавали аутологичные и неаутологичные меланомы. Нетрансдуцированные Т-клетки использовали в качестве отрицательного контроля. Окрашивание на CD107a на поверхности и внутриклеточный TNF после активации в течение 4 ч. (B) Т-клетки от пациента MM909.11, трансдуцированные TCR MC.7.G5, уничтожали аутологичные и неаутологичные меланомы, но не здоровые клетки. Анализ цитотоксичности на основе высвобождения хрома с использованием нетрансдуцированных (-) и трансдуцированных TCR MC.7.G5 (+) Т-клеток от пациента MM909.11 в сравнении с аутологичной меланомой, меланомой от пациента MM909.24 (дикий тип и нокаут MR1 (-/-)) и здоровыми клеточными линиями: SMC3 (гладкомышечных клеток); CIL-1 (клеток реснитчатого эпителия; и Hep2 (гепатоцитов). Выполняли в соотношении Т-клеток и клеток-мишеней, составляющем 5:1, в течение 6 и 18 ч.

Фиг. 16. (A) Фенотипирование с помощью проточной цитометрии MC.7.G5. (B) Геномная последовательность локуса MR1 меланомы MM909.24 с индуцированной с помощью CRISPR-Cas9 двуваллельной делецией в экзоне 2 MR1. (C) Экспрессию MR1 в клетках-мишенях, использованных на фиг. 14A-D, оценивали с помощью антитела против MR1. (D) Окрашивание на rCD2 Т-клеток от пациентов с меланомой MM909.11 и MM909.24 с и без трансдуцированного TCR MC.7.G5.

Фиг. 17. Уничтожение с помощью MC.7.G5 ряда линий раковых клеток (ось x) различного происхождения (разъяснение) после совместной инкубации в течение 48 часов ("длительный анализ уничтожения") (A). Показано, что MC.7.G5 был способен уничтожить 95-99,9% каждой клеточной линии, дополняя тем самым данные сравнительно более коротких анализов уничтожения, представленных на фиг. 4. Инкубировали в соотношении Т-клеток и клеток-мишеней, составляющем 5:1, и степень уничтожения определяли путем подсчета шариков или контрольных клеток, меченных CFSE. (B) MC.7.G5 не уничтожал нормальные клетки при совместной инкубации в течение 7 дней. Соотношение Т-клеток и клеток-мишеней составляло 5:1, и подсчет шариков использовали для определения количества оставшихся клеток-мишеней. SMC3 (гладкомышечные клетки), Hep2 (гепатоциты) и MRC5 (фибробласты кожи). Меланому MM909.11 использовали в качестве положительного контроля. С представлением в виде количества клеток-мишеней (здоровых или меланомы) на 1000 счетных шариков $\pm$ MC.7.G5. (C) MC.7.G5 точно уничтожал меланому MM909.24. Инкубировали в течение 7 дней, и контрольные клетки, меченные CFSE, использовали для установления степени уничтожения. В этом же анализе нормальная клеточная линия Hep2 не подвергалась уничтожению.

На фиг. 18 показано, что сверхэкспрессия MR1 с мутацией K43A ("пустого") в клетках C1R не при-

водила к активации MC.7.G5 (A), несмотря на высокую степень окрашивания CIR-K43A антителом MR1 (B). Напротив, сверхэкспрессия MR1 дикого типа в CIR вызывала активацию MC.7.G5. Это дополнительно демонстрирует, что TCR MC.7.G5 распознает MR1 со связанным грузом, и подкрепляет данные на фиг. 14E, показывающие отсутствие окрашивания MC.7.G5 "пустым" тетрамером MR1 с K43A.

Подробное описание

Методы и материалы

Получение и характеристика Т-клеточного клона MC.7.G5

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) из крови здорового донора очищали с помощью стандартного разделения в градиенте плотности, а затем стимулировали с использованием линии клеток альвеолярного эпителия базальной мембраны аденокарциномы человека, A549 (номер в ATCC® - CCL-185 для условий культивирования и справочной информации). Для отслеживания пролиферации Т-клеток в ответ на A549, PBMC метили красителем для клеток сукцинимидиловым эфиром карбоксифлуоресцеина (CFSE, Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). PBMC тщательно промывали в PBS, затем инкубировали при 37°C в течение 10 мин в темноте с 1 мкл CFSE, с последующим гашением избыточным количеством фетальной бычьей сыворотки. PBMC, меченные CFSE, культивировали отдельно или с A549 в 24-луночных планшетах для культивирования тканей с плотностью $6-8 \times 10^6$ PBMC и $0,1-0,2 \times 10^6$ A549 в среде для примирования Т-клеток (Theaker et al., 2016). Культуральные среды меняли (50% по объему) три раза в неделю, и клетки инкубировали в общей сложности в течение 2 недель. Для оценки степени пролиферации в ответ на A549, клетки собирали из культуры, промывали в PBS и метили красителем для жизнеспособных клеток Vivid (в разведении 1:40 в PBS, затем 2 мкл на пятно в 50 мкл) и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин перед добавлением антитела против CD3 (BW264/56, Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Германия) в течение еще 20 мин на льду. Путем установки дискриминационного окна осуществляли сортировку клеток на лимфоциты (прямое рассеяние на фоне бокового рассеяния), одиночные (прямое рассеяние на фоне бокового рассеяния) и Vivid⁺ CD3⁺ клетки, а для анализа двумерных графиков представляли как антитело против CD3 в функции CFSE. Клетки CFSE^{низкий уровень} (подвергшиеся пролиферации Т-клетки) сортировали с использованием BD FACS Aria (Central Biotechnology Services, Cardiff University, Великобритания) для клонирования методом предельных разведений, как описано ранее (Theaker et al., 2016). Перед выполнением анализов активации, MC.7.G5 собирали, промывали и инкубировали в течение 24 ч в среде с пониженным содержанием сыворотки, как описано ранее (Wooldridge et al., 2012). Впоследствии MC.7.G5 (30000 на лунку планшета с 96 U-образными лунками) инкубировали с A549 (60000 на лунку), которые либо оставляли немечеными, либо метили с использованием 10 мкг/мл антител против MHC класса I W6/32, BioLegend, San Diego, CA) или против MHC класса II (Tu39, BioLegend) в течение 1 ч. Без промывки MC.7.G5 добавляли в лунки до конечного объема 100 мкл, при этом этот клон также инкубировали отдельно или с 10 мкг/мл фитогемагглютинаина (PHA). После инкубации в течение ночи супернатанты собирали и анализировали с использованием TNF α -специфического ELISA (R&D Research, Minneapolis, MN). MC.7.G5 окрашивали антителами для обнаружения экспрессии на поверхности CD3 (Miltenyi Biotec), CD8 (BW135/80, Miltenyi Biotec), CD4 (M-T466, Miltenyi Biotec), $\gamma\delta$ TCR (11F2, Miltenyi Biotec) и $\alpha\beta$ TCR (BW242/412, Miltenyi Biotec). Для окрашивания клон собирали из культуры, промывали PBS и метили красителем для жизнеспособных клеток Vivid при комнатной температуре (RT), а затем каждым из антител отдельно в течение 20 мин на льду. Сбор данных выполняли на Becton Dickinson FACS Canto II, и данные анализировались с использованием программного обеспечения FlowJo (Tree Star). Сортировку путем установки дискриминационного окна на размер клеток (дискриминационного окна на лимфоциты), Vivid⁺ клетки, а затем представляющий интерес маркер клеточной поверхности представляли в виде гистограммы.

MC.7. G5 не реагирует на нормальные клетки

Клетки от здоровых индивидуумов и запатентованную для них культуральную среду получали от Sciencell (Carlsbad, CA) и использовали в качестве клеток-мишеней в анализах активации и цитотоксичности, описанных здесь в другом месте в разделе "Материалы и методы". SMC3 (гладкомышечные клетки ободочной кишки человека), CIL-1 (клетки не пигментированного цилиарного эпителия человека) и Hep2 (гепатоциты человека) все использовали в количестве 60000 клеток на лунку планшета с 96 U-образными лунками. Кроме того, MRC-5 (фибробласты легких, номер в ATCC® - CCL-171), который экспрессирует hTERT для задержки старения, также использовался в тех же анализах.

Последовательность α - и β -цепей TCR MC. 7.G5

РНК экстрагировали, используя набор RNEasy Micro (Qiagen). кДНК синтезировали, используя набор 5'/3' SMARTer (Clontech, Paris, Франция) в соответствии с инструкциями производителя. В подходе с использованием SMARTer использовалась обратная транскриптаза вируса лейкоза мышей Молони (MMLV), 3' олиго-dT праймер и 5' олигонуклеотид для получения кДНК-матриц, которые были фланкированы известной универсальной якорной последовательностью. Затем проводили ПЦР, используя одну пару праймеров. Обратный праймер, специфичный для константной области TCR- β , (C β -R1, 5'-GAGACCCTCAGGCGGCTGCTC-3', SEQ ID NO: 9, Eurofins Genomics, Ebersberg, Германия) и специфич-

ческий для якоря прямой праймер (Clontech) использовали в следующей ПЦР-реакции: 2,5 мкл кДНК-матрицы, 0,25 мкл высокоточной Taq полимеразы Phusion, 10 мкл 5X буфера Phusion, 0,5 мкл DMSO (все от Thermo Fisher Scientific), 1 мкл dNTP (50 мМ каждый, Life Technologies), 1 мкл каждого праймера (10 мкл) и не содержащая нуклеаз вода до конечного объема реакции, равного 50 мкл. Впоследствии, 2,5 мкл продуктов первой ПЦР брали для проведения "вложенной" ПЦР, как описано выше, с использованием пары вложенных праймеров (C β -R2, 5'-TGTGTGGCCAGGCACACCAGTGTG-3, SEQ ID NO: 10, Eurofins Genomics и специфичного для якоря праймера от Clontech). Для обеих ПЦР-реакций условия циклирования были следующими: 94°C в течение 5 мин, 30 циклов, каждый состоящий из 94°C в течение 30 с, 63°C в течение 30 с, 72°C в течение 90 с и, наконец, 72°C в течение 10 мин. Конечные продукты ПЦР вносили на 1% агарозный гель и очищали с использованием набора для экстракции из геля QIAEX II (Qiagen). Очищенные продукты клонировали в Zero-Blunt TOPO и трансформировали в химически компетентные клетки E.coli One Shot для стандартного секвенирования (оба от Life Technologies).

Клон MC.7.G5 реагирует на широкий ряд опухолей-мишеней

Анализ активации выполняли, как описано выше, а анализы на цитотоксичность, используя либо меченные хроматом натрия (Хром⁵¹) клетки-мишени (Ekeruche-Makinde et al., 2012), либо длительный анализ уничтожения на основе проточной цитометрии (смотрите в другом месте в разделе "Материалы и методы"). Для анализов высвобождения хрома каждую линию клеток метили 30 мКи Cr⁵¹ (Perkin Elmer, Waltham, MA) на 1×10^6 клеток, и 2000 клеток-мишеней использовали на лунку (планшетов с U-образными лунками) с MC.7.G5 для достижения желаемых соотношений Т-клеток и клеток-мишеней. После инкубации в течение ночи супернатанты собирали, смешивали со сцинтиллятором и считывали, используя счетчик Microbeta, и специфический лизис рассчитывали, как описано ранее (Ekeruche-Makinde et al., 2012). В дополнение к A549 и HEK293T, приведенным выше, особенностями используемых линий раковых клеток является следующее: название клеточной линии (номер в ATCC® или номер в ECACC для справочной информации и информации о культуре)/ткань или орган происхождения: HEK293T (эмбриональная почка, CRL-1573); LnCaP (CRL-1740)/предстательная железа; SiHa (HTB-35) и HeLa (CCL-2)/шейка матки; MCF7 (HTB-22), MDA-MB-231 (CRM-HTB-26) и T47D (HTB-133)/молочная железа; TK143 (CRL-8303) и U20S (HTB-96)/кость; HCT-116 (CCL-247)/ободочная кишка; Jurkat (TIB-152), T2 (0,174×CEM.T2) (CRL-1992), K562 (CCL-243), CIR, экспрессирующая HLA-A2 (CRL-1193), THP-1 (TIB-202), U266 (TIB-196) и Molts (CRL-1552)/все кровь; FM74 (ECACC 13012422), SK-Mel-28 (HTB-72) и FM45 (ECACC 13012410)/все меланомы кожи. RC177 (почки, почечно-клеточная карцинома), MM909.11, MM909.15 и MM909.24 (все меланомы кожи) были получены от пациентов с раком, получавших лечение в Center for Cancer Immune Therapy (CCIT, Herlev Hospital, Copenhagen, Дания).

Клоны Т-клеток

HLA-A*0201-рестриктированный клон MEL5/13, распознающий пептиды EAAGIGILTV и ELA-GIGILTV (гетероклитик L в положении 2) из Melan A (Woodridge et al. (2010); Lissina et al. (2009)) и канонический MAIT клон культивировали, как описано ранее (Tungatt et al. (2014)).

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

Был использован подход к созданию охватывающей весь геном библиотеки CRISPR/Cas9 (фиг. 5 и 14 для обзора, а также описанный недавно (Patel et al., 2017)). HEK293T с целенаправленным нокаутом по всему геному, используя суббиблиотеки A и B GeCKO v2 (плазмиду Adgene, № 1000000048, депонированной Dr. Feng Zhang), использовали для селекции с помощью MC.7G.5. Вкратце, успешно трансдуцированные HEK293T (MOI 0,4), отобранные с использованием пуромицина, инкубировали вместе с MC.7G.5 в предопределенном соотношении, составляющим 1:1, в течение 2-3 недель в 96-луночных плоскодонных планшетах. Геномную ДНК из HEK293T, которые выдерживали два цикла селекции с использованием MC.7G.5, использовали для секвенирования следующего поколения для выявления вставленных направляющих РНК и, следовательно, генов, которые становились мишенями для удаления.

Клон MC.7.G5 демонстрирует специфичность к мишени через MR1

Используя тот же подход, что и выше, для блокирующих МНС антител также проводили анализ активации с использованием антитела против MR1, фиг. 6 и фиг. 14 (клон 26.5, BioLegend). MC.7.G5 использовали в анализе активации с клетками A549 и MM909.24, на которые была направлена технология CRISPR/Cas9, чтобы устранить экспрессию гена MR1, как описано ранее (Laugel et al., 2016). Линии клеток использовали в анализах активации и высвобождения хрома, как указано выше. Полноразмерный ген MR1, оптимизированный в отношении частоты использования кодонов, конструировали в виде лентивирусных частиц и трансдуцировали в клетки-мишени, используя аналогичные методы (в данном случае один ген, а не CD2 крысы), описанные ниже для TCR MC.7G.5, для создания линий сверхэкспрессирующих (с высоким уровнем экспрессии) MR1 клеток. Экспрессию MR1 оценивали с использованием 10 мкг/мл антитела против MR1 (как указано выше) и 50000 клеток на пятно в 50 мкл PBS с 2% FBS. Нокаут MR1 в MM909.24 был достигнут, как описано выше для A549 (6). Анализы активации выполняли, как описано выше, с линиями клеток: MM909.24 wt, MM909.24 MR1^{-/-}, MM909.24 MR1^{Высокий уровень}, pt146 wt (линия В-лимфобластоидных клеток), pt146 MR1^{-/-} и pt146 MR1^{Высокий уровень}.

Клон MC.7.G5 не окрашивается тетрамерными формами лиганда для MAIT MR1-5-OP-RU или

MR1-As-6-FP.

МС.7.G5 собирали из культуры, промывали PBS+2% FBS, затем обрабатывали 50 нМ ингибитора протеинкиназы (PKI), Дазатинибом (Lissina et al., 2009), затем метили PE-конъюгированными тетрамерами, собранными с использованием MR1, подвергнутым рефолдингу вместе с либо As-6-FP, либо 5-OP-RU, фиг. 6 и 14. Окрашенные тетрамером клетки метили неконъюгированным антителом против PE, как описано ранее (Tungatt et al., 2015), а затем Vivid и антителом против CD8. Реагирующий с MR1-5-OP-RU клон МАИТ окрашивали таким же образом, чтобы он служил в качестве положительного контроля. Клетки сортировали по размеру путем установки дискриминационного окна, затем Vivid⁺ CD8⁺ и представляли в виде гистограмм флуоресценции тетрамера с получением и анализом данных, как описано выше.

As-6-FP и обусловленная *M. smeg* инфекция ослабляет распознавание клоном МС.7.G5, несмотря на усиление экспрессии MR1 на поверхности клеток.

МС.7.G5 использовали в анализе активации с использованием клеток-мишеней (ММ909.24 и A549), которые были предварительно инкубированы с 50 мкг/мл (фиг. 8) и 1, 10 или 100 мкг/мл (фиг. 14) As-6FP. Кроме того, также использовались клетки A549, нагруженные *M. smeg*. Клетки-мишени, которые оставляли без обработки/без загрузки, использовали в качестве отрицательных контролей, фиг. 8 и 14. A549 инкубировали с *M. smeg* при MOI, составляющей 100:1 для соотношения *M. smeg* и A549, в течение 2 ч в среде без антибиотиков, с последующим промыванием клеток в колбе для культивирования, а затем культивированием в течение 2 ч в R10. МС.7.G5 и МАИТ клон инкубировали в течение 4-5 ч в присутствии ингибитора процессинга TNF (TAPI-0 (30 мкМ) и антитела против CD107a (H4A3, BD), затем окрашивали антителом против TNF (сA2, Miltenyi Biotec), антителом против CD3, антителом против CD8 и Vivid. Сортировали путем установки дискриминационного окна на размер, одиночные, Vivid⁺ CD3⁺ клетки, затем CD8⁺ на фоне CD107a или TNFα с получением и анализом данных, как описано выше. Каждую из клеток-мишеней также окрашивали антителом против MR1 после инкубации с As-6FP или *M. smeg* в концентрации 10 мкг/мл используя 50000 клеток на пятно в 50 мкл в PBS с 2% FBS.

Трансдукция поликлональных Т-клеток с использованием TCR МС.7.G5 (как показано на фиг. 2) обеспечивает распознавание опухолей.

Оптимизированные в отношении частоты использования кодонов, полноразмерные цепи TCR, разделенные саморасщепляющейся последовательностью 2A, были синтезированы (Genewiz) и клонированы в лентивирусный вектор для переноса 3-го поколения pELNS (любезно предоставлен Dr. James Riley, University of Pennsylvania, PA). Вектор содержит маркерный ген CD2 крысы (rCD2), отделенный от TCR другой саморасщепляющейся последовательностью 2A. Лентивирусные частицы получали путем трансфекции с использованием хлорида кальция клеток HEK293T. Векторы для переноса TCR котрансфицировали вместе с плазмидами для упаковки и оболочки pMD2.G, pRSV-Rev и pMDLg/pRRE. Лентивирусные частицы концентрировали с помощью ультрацентрифугирования перед трансдукцией CD8⁺ Т-клеток с использованием 5 мкг/мл полибрена, при этом CD8⁺ Т-клетки от здоровых доноров (фиг. 9) или пациентов с меланомой (фиг. 15) очищали с помощью магнитного отделения (Miltenyi Biotec) за 24 ч и активировали в течение ночи шариками с CD3/CD28 (Dynabeads, Life Technologies) в соотношении шариков и Т-клеток, составляющем 3:1. Т-клетки, которые захватили вирус, отбирали путем обогащения с использованием PE-конъюгированного антитела против rCD2 (OX-34, BioLegend), а затем магнитных шариков против PE (Miltenyi Biotec). Через 14 дней после трансдукции Т-клетки размножали с использованием аллогенных фидерных клеток. Для всех функциональных экспериментов Т-клетки, трансдуцированные TCR МС.7.G5, были позитивными по rCD2 на >95% и использованы для функционального анализа (фиг. 16). Трансдуцированные клетки инкубировали с клетками-мишенями в течение 4-5 ч в присутствии 30 мМ антитела против CD107a TAPI-0 и затем окрашивали антителами против TNFα, CD3, CD8, а также Vivid. Сортировали путем установки дискриминационного окна на размер, одиночные, vivid⁺ CD3⁺ клетки, затем CD8⁺ против CD107a или TNFα. Сбор данных и анализ, как указано выше. Трансдуцированные TCR Т-клетки от пациентов также использовали для анализа цитотоксичности на основе высвобождения хрома (фиг. 15), как описано выше.

Проточная цитометрия

Клетки окрашивали фиксируемым фиолетовым красителем Live/Dead™ (Life Technologies) и антителами против следующих поверхностных структур: pan-αβ TCR с PE (клон IP26, Biolegend), pan-γδ TCR-FITC (клон REA591, Miltenyi Biotec), CD3 с PerCP (клон UCHT1, Biolegend), CD4-APC (клон VIT4, Miltenyi Biotec), CD8 с PE (клон BW135/80, Miltenyi Biotec), крысиного CD2 cPE (клон OX-34, Biolegend) и MR1 с PE (клон 26.5, Biolegend). Для окрашивания конъюгированными с PE антителами против MR1 использовали Fc Block (Miltenyi Biotec) в соответствии с инструкциями производителя. Для окрашивания тетрамерами мономеры MR1 были предоставлены Jamie Rossjohn (Monash University), а мономеры pMHC получали собственными силами. Тетрамеры собирали и использовали для оптимизированного окрашивания, как описано ранее (Tungatt et al (2014)). Данные получали на BD FACS Canto II (BD Biosciences) и анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo (TreeStar).

Нокаут MR1-нокаут и экспрессия трансгена

Лентивирус, кодирующий одноцепочечную направляющую РНК (sgRNA) для MR1 и CRISPR/Cas9, получали и использовали, как описано ранее (Laugel et al. (2016)). Трансген MR1 клонировали в основу лентивирусного вектора pRRL.sin.cppt.pgk-gfp.wpre второго поколения, разработанную в лаборатории Didier Trono (Addgene № 12252), лишенную промотора PGK человека и кДНК для GFP, и лентивирусные частицы получали, как описано для sgRNA для MR1 (Laugel et al. (2016)). Клетки-мишени подвергали трансфекции при центрифугировании в присутствии 8 мкг/мл полибрена, 500×g в течение 2 ч при 37°C (Shalem et al. (2014)). Позитивные по конъюгированному с PE антителу против MR1 (клон 26.2, Biolegend) клетки обогащали магнитным способом, используя магнитные шарики против PE, в соответствии с инструкциями производителя (Miltenyi Biotec).

Секвенирование TCR и трансдукция с его использованием

TCR MC.7.G5 секвенировали собственными силами, используя набор SMARTer RACE (Clontech) и двухстадийную полимеразную цепную реакцию с использованием универсальных прямых праймеров и обратных праймеров, специфичных для константных областей TCR-α и TCR-β. Затем TCR синтезировали с оптимизацией в отношении частоты использования кодонов (Genewiz), при этом полноразмерные цепи TCR были разделены саморасщепляющейся последовательностью 2A (Ryan et al 1991). TCR клонировали в лентивирусный вектор pELNS третьего поколения (любезно предоставленный James Riley, University of Pennsylvania), который содержит rCD2, отделенный от TCR второй саморасщепляющейся последовательностью 2A. Лентивирусные частицы получали путем трансфекции с использованием хлорида кальция клеток HEK293T и концентрировали путем ультрацентрифугирования. PBMC после терапии получали от пациентов MM909.1 и MM909.24, и CD8 и CD4 T-клеток очищали путем магнитного обогащения (Miltenyi Biotec). Впоследствии T-клетки активировали путем инкубации в течение ночи с шариками с CD3/CD28 (Dynabeads; Life Technologies) при соотношении шариков и T-клеток, составляющем 3:1. Затем T-клетки трансдуцировали с использованием TCR MC.7.G5 в присутствии 5 мкг/мл полибрена (Santa Cruz Biotechnology). В соответствии с инструкциями производителя (Miltenyi Biotec) T-клетки, которые поглотили вирус, обогащали магнитным способом с использованием магнитных шариков с антителами против rCD2 и PE. Через 14 дней после трансдукции T-клетки размножали, как описано ранее (Tungatt et al (2014)). Для всех функциональных экспериментов трансдуцированные T-клетки были на >85% rCD2+ (фиг. 16D).

Скрининг GeCKOv.2 по всему геному

Получали лентивирусные частицы для библиотеки GeCKOv.2 (плазмида была любезно предоставлена Feng Zhang (Sanjana et al (2014)) (Addgene плазмида # 1000000048)). Библиотека GeCKOv.2 состоит из 12341 одиночных направляющих РНК (sgRNA), нацеленных на 19050 кодирующих белки генов (6 sgRNA на ген), и 1864 микроРНК (4 sgRNA на микроРНК) и использовалась в виде лентивируса для трансдукции линии клеток-мишени HEK293T. 4×10^7 клеток HEK-293T трансдуцировали с MOI=0,4 для обеспечения 100-кратного перекрытия каждой библиотеки. Клетки, которые поглотили лентивирус, отбирали с помощью пуромицина. Через 14 дней половину библиотеки замораживали в качестве контроля. MC.7.G5 добавляли к остальным трансдуцированным клеткам HEK-293T в соотношении T-клеток и HEK293T, составляющем 0,25:1, в среде с 20 МЕ IL-2. Через 14 дней MC.7.G5 снова добавляли в соотношении 0,5:1. Через 7 дней клетки HEK293T использовали для секвенирования. Геномную ДНК из 3×10^7 клеток HEK-293T (контрольных без отбора и отобранных с использованием MC.7.G5) выделяли (с использованием набора GenElute Mammalian Genom DNA Miniprep Kit, Sigma Aldrich). Всю выделенную геномную ДНК (2,5 мкг на 50 мкл реакции) использовали для последующей ПНП, чтобы обеспечить полное представление библиотек. Двухстадийную ПЦП проводили, как описано ранее (Shalem et al. (2014)), используя очищенные с помощью HPLC праймеры и NEBNext High Fidelity PCR MasterMix (New England BioLabs). Продукты ПЦП размером <300 п.н. впоследствии выделяли из агарозного геля и секвенировали на приборе HiSeq (Illumina) с 80 циклами считывания 1 (для определения последовательности sgRNA) и 8 циклами считывания 2 (для идентификации специфического для образца баркода). Анализ обогащенных направляющих проводили с использованием анализа MAGeCK (Li et al. (2014)).

Длительный анализ уничтожения

Для анализов уничтожения на основе проточной цитометрии 5000-10000 раковых или нормальных клеточных линий помещали в планшеты с 96 U-образными лунками, и добавляли клон MC.7.G5, чтобы получить пять T-клеток на каждую клетку-мишень (экспериментальные лунки). Клетки сокультивировали в 200 мкл среды для клеток-мишеней с добавлением 20 МЕ IL-2 и 25 нг/мл IL-15. Клетки-мишени (контрольные лунки), MC.7.G5 и CFSE-меченные CIR также культивировали отдельно для способствования анализу. Клетки инкубировали в течение 48 ч. Для анализа чувствительности количество MC.7.G5 титровали относительно клеток-мишеней и инкубировали в течение 7 дней. В дополнение к клеточным линиям, описанным в другом месте в разделе "Материалы и методы", также использовалась линия клеток рака яичника A2780 (ECACC 931 12519). Перед сбором в каждую лунку добавляли $0,1 \times 10^6$ меченных CFSE (0,1 мкМ) клеток CIR, чтобы можно было определить количество клеток-мишеней, оставшихся в экспериментальной и контрольной лунках. Клетки трижды промывали охлажденным D-PBS с добавле-

нием 2 mM EDTA, затем окрашивали в аналитических планшетах с использованием фиксируемого флюоресцентного красителя Live/Dead™ (Life Technologies), затем антител против CD3 с PerCP (клон UCHT1, BioLegend) и/или против TCR с APC TRBV25.1 (TRBV11 в соответствии с номенклатурой Arden: каталожный номер A66905, Beckman Coulter), чтобы сделать возможным путем установки дискриминационного окна отделение мертвых клеток и Т-клеток, оставляя жизнеспособные клетки-мишени для анализа. Процент уничтожения рассчитывался, используя следующее уравнение: % уничтожения = $100 - ((\text{экспериментальные события с клетками-мишенями} \div \text{экспериментальные события с шариками или CFSE-мечеными клетками CIR}) \div (\text{контрольные события с клетками-мишенями} \div \text{контрольные события с шариками или CFSE-мечеными клетками CIR})) \times 100$.

Анализ активации с использованием клеток CIR, экспрессирующих "пустой" (K43A) MR1

Клетки CIR трансдуцировали MR1 с мутацией K43A (R. Reantragoon et al.), как в случае MR1 дикого типа. Анализ активации и проточную цитометрию проводили, как описано в другом месте в разделе "Материалы и методы".

Результаты

Характеристика клона

1. Т-клеточный клон MC.7.G5 распознает клетки A549 (фиг. 1A). Добавление 10 мкг/мл блокирующих MHC-I и MHC-II антител не препятствовало распознаванию (фиг. 1B).

2. Окрашивание антителами и проточная цитометрия подтвердили, что клон MC.7.G5 экспрессирует $\alpha\beta$ TCR и является CD8+ (фиг. 1C и с повтором на фиг. 16A).

3. Важно, что Т-клеточный клон MC.7.G5 не реагирует на нормальные (не раковые) клеточные линии (фиг. 2 и фиг. 17B и C). Когда TCR MC.7.G5 экспрессировали в первичных CD8 Т-клетках, он не опосредовал уничтожение нормальных клеток (фиг. 15B). Клон MC.7.G5 не реагировал ни на самого себя, ни на свежевыделенные моноклеарные клетки периферической крови (не показано). Т-клеточный клон MC.7.G5 был выделен от нормального здорового донора, у которого он не наносил видимых повреждений. Авторы настоящего изобретения делают заключение, что Т-клеточный клон MC.7.G5 является опухолеспецифическим.

4. Т-клеточный клон MC.7.G5 экспрессирует TCR, образуемый из TRAV38.2/DV8 TRAJ31 и TRBV25.1 TRBJ2.3 последовательности, показанной на фиг. 3. MR1-рестриктированный клон MC.7.G5 не является MAIT, и он не экспрессирует α -цепь TCR MAIT.

5. Т-клеточный клон MC.7.G5 образует MTP1 β (фиг. 4A) и TNF α (фиг. 4A) в ответ на широкий ряд линий раковых клеток. MC.7.G5 также обладает высокой цитотоксичностью по отношению ко многим раковым клеткам (фиг. 4B и 17A) даже при очень низких соотношениях эффектора и мишени (фиг. 4B и 17C). MC.7.G5 распознал все типы протестированных раков: рака крови, кости, меланому (кожи), рак ободочной кишки, почки, легкого, шейки матки, молочной железы, яичника и предстательной железы. Кроме того, эта цитотоксичность была эффективной и чувствительной: данные длительного (48-часового) анализа уничтожения показали составляющее >95% уничтожение линий раковых клеток (фиг. 17A) и при низком соотношении Т-клеток и клеток-мишеней (фиг. 17C).

6. Охватывающие весь геном рака-мишени MC.7.G5 библиотеки CRISPR/Cas9 позволили выявить MR1 в качестве лиганда MC.7.G5 путем создания линии-мишени, устойчивой к лизису клоном MC.7.G5. Секвенирование направляющих РНК в этой резистентной линии показало, что они в основном нацелены на гены, участвующие в метаболизме и иммунной системе. Направляющие РНК для MR1 и β 2 микроглобулина были очень обогащены в популяции клеток, которые были устойчивы к лизису клоном MC.7.G5. Эти гены сразу привлекли внимание авторов настоящего изобретения из-за их связи с активацией MAIT-клеток (для свертывания MR1 требуется β 2-микроглобулин).

7. Блокирование антителом против MR1 устраняет распознавание линии клеток A549 (фиг. 6A и с повтором на фиг. 14).

8. Линии раковых клеток A549 (клон c9) и MM909.24 (клон c4) не распознавались при нокауте MR1 в этих линиях (фиг. 6B и C и 14). Сверхэкспрессия MR1 в MM909.24 с помощью трансдукции лентивирусом слегка усиливает распознавание (фиг. 6D и 14).

9. Линия LCL pt146 не распознается Т-клеточным клоном MC.7.G5. MC.7.G5 также не распознает клетки pt146, даже когда они трансдуцированы MR1-экспрессирующим лентивирусом и демонстрируют некоторую экспрессию MR1 на клеточной поверхности. Линия LCL pt146 не экспрессирует лиганд для Т-клеток MC.7.G5. Это говорит о том, что MC.7.G5 не реагирует на MR1 как таковой, а скорее распознает уникальный специфический для рака лиганд в связывающем желобке MR1 (фиг. 6).

10. Клон MC.7.G5 не окрашивается тетрамерами MR1, нагруженными Ac-6-FP или 5-OP-RU (фиг. 7 и с повтором на фиг. 14E). MAIT Т-клеточные клоны окрашиваются тетрамерами MR1-5-OP-RU в параллельном анализе. Авторы настоящего изобретения заключают, что MC.7.G5 не связывается с лигандами для MAIT. Этот вывод согласуется с тем, что MC.7.G5 не экспрессирует α -цепь инвариантного TRAV1-2 канонического MAIT. Это было подтверждено с использованием "пустых" (K43A) тетрамеров MR1, которые не окрашивали MC.7.G5. Мутация K43A в MR1 делает возможным рефолдинг MR1 в отсутствие связанного груза, фиг. 14. Аналогично, экспрессия пустого (K43A) MR1 не приводит к распознаванию

клоном MC.7.G5, несмотря на хорошую экспрессию MR1 на поверхности клеток C1R (окрашивание с использованием антител против MR1 - правая панель), фиг. 18. Это дополнительно демонстрирует, что экспрессируемый раком лиганд, связанный с MR1, важен для активации MC.7.G5.

10. Добавление 10, 50 или 100 мкг/мл лиганда для MR1 Ас-6-FP (<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=4pj5>) на 12 ч существенно усиливает экспрессию MR1 на поверхности клеток MM909.24 (фиг. 8 и 14G), но ослаблял распознавание этих клеток клоном MC.7.G5 (фиг. 8 и 14G). Этот результат убедительно свидетельствует о том, что клон MC.7.G5 распознает связанный с MR1 лиганд, который отличается от Ас-6-FP, на поверхности клеток MM909.24. Аналогичные результаты были обнаружены с клетками A549. Инкубация клеток A549 с Ас-6-FP ослабляла распознавание, увеличивая при этом экспрессию MR1 на поверхности. Подвергание клеток A549 воздействию *Mycobacterium smegmatis* (M.smeg) также усиливало экспрессию MR1. Это ожидалось, поскольку известно, что M. smeg продуцирует лиганды для MR1. Эти лиганды могут распознаваться MAIT клетками. Клетки A549, инфицированные M. smeg, были хорошим лигандом для MAIT клона в параллельном эксперименте (фиг. 8 и 14F). Подвергание клеток A549 воздействию M. smeg существенно ослабляло распознавание клоном MC.7.G5. Авторы настоящего изобретения заключают, что клон MC.7.G5 распознает раковые клетки через лиганд в связывающем желобке MR1, который присутствует только на раковых клетках.

11. Трансдукция TCR MC.7.G5 в поликлональные Т-клетки позволяет им распознавать опухолевые мишени (фиг. 9). Действительно, CD8 Т-клетки от пациента с метастатической меланомой MM909.11, трансдуцированные TCR MC.7.G5, уничтожали аутологичные и неаутологичные меланомы, но не нормальные клетки (фиг. 15). Авторы настоящего изобретения заключают, что распознавание опухоли клоном MC.7.G5 происходит с помощью Т-клеточного рецептора MC.7.G5, представленного на фиг. 3, через лиганд, презентруемый молекулой MR1.

Подход к функциональному скринингу всего генома с использованием системы CRISPR/Cas9, используя библиотеку GeCKOv.2, в котором на каждый кодирующий белок ген в геноме человека нацелено шесть различных одиночных направляющих (sg) РНК, был использован для идентификации генов, необходимых для распознавания клеток-мишеней клоном MC.7.G5 (фиг. 13A). После двух циклов селекции с использованием MC.7.G5 выжившие трансдуцированные клетки HEK293T продемонстрировали уменьшенную способность к стимуляции MC.7.G5, что позволяет предположить, что основные гены, участвующие в их распознавании, были удалены (фиг. 13B). Секвенирование sgRNA системы CRISPR в устойчивых к лизису клетках HEK293T показало, что мишенями для более чем одной обогащенной sgRNA являются только 6 генов: β 2M (пять sgRNA), MR1 (две sgRNA), регуляторный фактор X (RFX, пять sgRNA), связанный с RFX анкирин-содержащий белок (RFXANK, пять sgRNA), ассоциированный с RFX белок (RFXAP, три sgRNA) и преобразователь сигнала и активатор транскрипции 6 (STAT6, две sgRNA) (фиг. 13C). RFX, RFXANK и RFXAP являются важными компонентами белкового комплекса, ответственного за транскрипцию промоторов β 2M, MHC I и MHC II. В сочетании с тем фактом, что β 2M и MR1 объединяются, образуя неполиморфную стабильную антигенпрезентирующую молекулу, о которой известно, что она активирует MAIT и другие MR1-рестриктированные Т-клетки, эти данные убедительно свидетельствуют о том, что Т-клетки MC.7.G5 распознают раки-мишени через инвариантную молекулу MR1. Соответственно, антитело против MR1, но не антитела против MHC I или MHC II, предотвращало распознавание клеток-мишеней с помощью MC.7.G5 (фиг. 14A). CRISPR-опосредованный нокаут MR1 из A549 и меланомы MM909.24 (делеционная мутация показана на фиг. 16B) защищал от MC.7.G5-опосредованного распознавания и лизиса (фиг. 14B). Меланома MM909.24 не окрашивалась антителом против MR1, что свидетельствует о том, что для распознавания мишени необходимы очень низкие уровни MR1 (фиг. 16C). Сверхэкспрессия MR1 приводила к сильному распознаванию слабо распознаваемых мишеней, HeLa и C1R, и слегка улучшала распознавание меланомы MM909.24 (фиг. 14C). Повторное введение MR1 в клетки A549 с нокаутом MR1 с помощью CRISPR/Cas9 восстанавливало распознавание с помощью MC.7.G5 (фиг. 14D), вселяя дополнительную уверенность в том, что распознавание раковых клеток было MR1-зависимым.

Известно, что MR1 презентрует промежуточные продукты биосинтеза рибофлавина на поверхности MAIT клеток и, как полагают, не экспрессируется на клеточной поверхности без связанного груза. MC.7.G5 не окрашивался тетрамерами, состоящими из MR1 с мутацией K43A, которая делает возможным рефолдинг MR1 без связанного лиганда. MR1-зависимое распознавание раковых клеток наводило на мысль о том, что MC.7.G5 может распознавать MR1-связанный метаболит, который специфически экспрессируется или активируется в злокачественных клетках. В соответствии с этой гипотезой MC.7.G5 не окрашивался тетрамерами, собранными с MR1, презентрующим активатор Т-клеток микробного происхождения 5-OP-RU. Кроме того, распознавание клеток-мишеней было ослаблено при загрузке либо MAIT-активирующей бактерии *Mycobacterium smegmatis* (M smeg) (фиг. 14F), либо лиганда для MR1 ацетил-6-формилптерин (Ас-6-FP) (22, 23) (фиг. 14G), несмотря на увеличение экспрессии MR1 на поверхности (фиг. 14G). Эти результаты указывают на то, что MC.7.G5 не распознает MR1 как таковой или MR1 с помощью известных механизмов, а скорее MR1 со связанным грузом, который специфичен для раковых клеток или связан с ними.

Секвенирование TCR MC.7.G5 позволило выявить новый TCR, состоящий из α -цепи TRAJ31 TRAV38.2/DV8, соединенной с β -цепью TRBJ2.3 TRBV25.1. Чтобы исследовать терапевтический потенциал нацеливания MR1 на раковые клетки, авторы настоящего изобретения очистили Т-клетки из PBMC от пациентов с меланомой стадии IV и трансдуцировали их лентивирусом, кодирующим TCR MC.7.G5, что привело к распознаванию и уничтожению аутологичных и неаутологичных меланом (фиг. 15), но не здоровых клеток (фиг. 15B). Уничтожение было специфическим для MR1, поскольку клетки, трансдуцированные TCRMC.7.G5, не лизировали меланомы с нокаутом MR1 (фиг. 15B). Авторы настоящего изобретения пришли к выводу, что TCR MC.7.G5 может перенаправлять Т-клетки пациента на уничтожение раковых клеток пациента, не требуя специфического HLA. MR1 является привлекательной мишенью для иммунотерапии рака благодаря своей неполиморфной, повсеместно представленной природе. Последние достижения в области MR1-тетрамеров и открытиях лигандов продвинули знания в этой области, но многое еще предстоит открыть. Здесь авторы настоящего изобретения подтвердили распознавание раковых клеток клоном Т-клеток, который реагировал на множество линии раковых клеток из различных типов тканей.

Длительные анализы уничтожения (фиг. 17) показывают уничтожение с помощью MC.7.G5 ряда линий раковых клеток различного происхождения. Фактически, MC.7.G5 был способен уничтожать 95-99,9% каждой клеточной линии. Кроме того, MC.7.G5 не уничтожал здоровые клетки.

Сверхэкспрессия мутированного K43A ("пустого") MR1 в клетках CIR не приводила к активации M.7.G5 (фиг. 18A), несмотря на сильное окрашивание CIR-K43A антителом против MR1 (фиг. 18B). Напротив, сверхэкспрессия MR1 дикого типа в CIR вызывала активацию MC.7.G5. Это показывает, что TCR MC.7.G5 распознает MR1 со связанным грузом.

Находящиеся в обращении антитела против MR1 не способны обнаружить низкую экспрессию MR1 на поверхности раковых клеток, несмотря на обнаруживаемую экспрессию мРНК. Действительно, уровень экспрессии MR1 на поверхности, необходимый для распознавания раковых клеток с помощью MC.7.G5, часто был ниже порога, необходимого для окрашивания антителами, что позволяет предположить, что TCR MC.7.G5 может быть способен реагировать на низкое количество копий лиганда для MR1, родственного Т-клеткам, распознающим рМНС. Результаты, полученные авторами настоящего изобретения, также демонстрируют огромные возможности скрининга всего генома с использованием системы CRISPR/Cas9 как платформы для обнаружения нетрадиционных Т-клеточных лигандов. Действительно, авторы настоящего изобретения также использовали эту технику, чтобы найти облигатные экспрессируемые на клеточной поверхности молекулы, необходимые для распознавания раковых клеток с помощью $\gamma\delta$ TCR, и авторы настоящего изобретения ожидают, что применяемые здесь методологии быстро революционизируют область нетрадиционных Т-клеток в результате открытия новых лигандов.

Таким образом, скрининг всего генома с использованием системы CRISPR был использован для выявления экспрессируемого раком лиганда MC.7.G5. Эксперименты по валидации MR1 показали, что активацию MC.7.G5 клетками A549 может предотвратить антитело против MR1, и клон не реагирует на нокаут MR1 по MR1 клетку A549, созданную в лаборатории авторов настоящего изобретения (Laugel et al. 2012), или миелому-мишень MM9909.24 с CRISPR/Cas9-опосредованным нокаутом MR1. MC.7.G5 реагировал на большинство линий раковых клеток, но не реагировал на первичные (неопухолевые) клетки. Для распознавания раковых клеток-мишеней с помощью MC.7.G5 требовалась экспрессия MR1. Единственный полиморфизм в MR1 является молчащим (Parga-Cuadrado et al. 2000), так что MR1-рестриктированные TCR могут реагировать на клетки от любого человека в популяции. Это делает MR1 особенно привлекательным кандидатом для подходов к адаптивной клеточной терапии, поскольку один продукт мог бы использоваться для всех пациентов (Guo et al. 2015).

Заключение

TCR MC.7.G5 позволяет Т-клеткам распознавать широкий ряд опухолей. Распознавание происходит через инвариантную в популяции молекулу MR1. MR1 обычно не экспрессируется на поверхности клетки в отсутствие лиганда в его связывающем желобке (Chua et al. 2011). Экспрессия лиганда, который связывается с MR1, позволяет молекуле перемещаться на поверхность клетки для презентации этого лиганда (фиг. 10). Добавление известных лигандов MR1 ослабляет распознавание опухоли клоном Т-клеток MC.7.G5 и предполагает, что MC.7.G5 распознает специфический для раковых клеток лиганд в связи с MR1 (фиг. 11) (т.е. другие лиганды конкурируют с раковым лигандом за связывания с MR1). Учитывая то, что известно о MR1, кажется вероятным, что этот лиганд является промежуточным продуктом в метаболическом пути, который активируется при онкогенезе. Текущие эксперименты направлены на определение природы этого лиганда.

Это изобретение сосредоточено вокруг TCR, идентифицированного в Т-клеточном клоне MC.7.G5. Этот TCR распознает широкий ряд раковых клеток через консервативный, родственник МНС белок (MR)1. Этот TCR не распознает неопухолевые клетки. Нокаут с помощью CRISPR/Cas9 MR1 в опухолевых линиях или блокирование антителом против MR1 предотвращает распознавание TCR. Инкубация с известными MR1-связывающими лигандами ослабляет распознавание TCR, что позволяет предположить, что лиганд для Т-клеточного рецептора (TCR) является специфическим для рака метаболитом, который

находится или презентуется TCR в связывающем желобке MR1. TCR MC.7.G5 можно использовать в ряде различных стратегий иммунотерапии рака. Широкое распознавание опухолей и независимость распознавания от лейкоцитарного антигена человека (HLA) открывают захватывающие возможности для иммунотерапии против любого типа рака для всей популяции, используя TCR.

Список литературы

- Chua WJ, Kim S, Myers N, Huang S, Yu L, Fremont DH, et al. (2011) Endogenous MHC-related protein 1 is transiently expressed on the plasma membrane in a conformation that activates mucosal-associated invariant T cells. *Journal of Immunology*, 186, 4744-50.
- Ekeruche-Makinde, J., M. Clement, D.K. Cole, E.S.J. Edwards, K. Ladell, J.J. Miles, K.K. Matthews, A. Fuller, K.A. Lloyd, F. Madura, G.M. Dolton, J. Pentier, A. Lissina, E. Gostick, T.K. Baxter, B.M. Baker, P.J. Rizkallah, D.A Price, L. Wooldridge and A.K. Sewell (2012). T cell receptor optimized skewing of the repertoire can enhance antigen targeting. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 37269-81.
- Guo T, Chamoto K, Hirano N. (2015) Adoptive T Cell Therapy Targeting CD1 and MR1. *Frontiers in immunology*. 6:247.
- Laugel B, Lloyd A, Meermeier EW, Crowther MD, Connor TR, Dolton G, et al. (2016) Engineering of Isogenic Cells Deficient for MR1 with a CRISPR/Cas9 Lentiviral System: Tools To Study Microbial Antigen Processing and Presentation to Human MR1-Restricted T Cells. *Journal of Immunology*, 197, 971-82.
- Li W., H. Xu, T. Xiao, L. Cong, M. I. Love, F. Zhang, R. A. Irizarry, J. S. Liu, M. Brown, X. S. Liu, (2014) MAGeCK enables robust identification of essential genes from genome-scale CRISPR/Cas9 knockout screens. *Genome Biology*. 15, 554.
- Lissina A., K. Ladell, A. Skowera, M. Clement, E. Edwards, R. Seggwiss, H. van den Berg, E. Gostick, K. Gallagher, E. Jones, J.J. Melenhorst, A.J. Godkin, M. Peakman, D.A. Price, A.K. Sewell and L. Wooldridge (2009) Protein kinase inhibitors substantially improve the physical detection of T-cells with peptide-MHC tetramers. *Journal of Immunological Methods*, 340, 11-24.
- Parra-Cuadrado JF, Navarro P, Mirones I, Setien F, Oteo M, Martinez-Naves E. A study on the polymorphism of human MHC class I-related MR1 gene and identification of an MR1-like pseudogene. *Tissue Antigens*. 2000;56(2):170-2.
- Patel, S.J. et al 2012 Identification of essential genes for cancer immunotherapy. *Nature*, 584, 537-542.
- R. Reantragoon, A. J. Corbett, I. G. Sakala, N. a Gherardin, J. B. Furness, Z. Chen, S. B. G. Eckle, A. P. Uldrich, R. W. Birkinshaw, O. Patel, L. Kostenko, B. Meehan, K. Kedzierska, L. Liu, D. P. Fairlie, T. H. Hansen, D. I. Godfrey, J. Rossjohn, J. McCluskey, L. Kjer-Nielsen, Antigen-loaded MR1 tetramers define T cell receptor heterogeneity in mucosal-associated

invariant T cells. The Journal of experimental medicine. 210, 2305-2320 (2013).

Ryan M.D., A. M. Q. King, G. P. Thomas, (1991) Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence. Journal of General Virology. 72, 2727-2732.

Sanjana N.E., O. Shalem, F. Zhang, (2014) Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. Nature Methods. 11, 783-784.

Shalem, N. E. Sanjana, E. Hartenian, X. Shi, D. A. Scott, T. S. Mikkelsen, D. Heckl, B. L. Ebert, D. E. Root, J. G. Doench, F. Zhang, (2014) Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. Science. 343, 84-87.

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

Tungatt, K., V. Bianchi, M.D. Crowther, W. E. Powell, A. J. Schauenburg, A. Trimby, M. Donia, A. Skowera, J. J. Miles, C. J. Holland, D. K. Cole, A. J. Godkin, M. Peakman, P. T. Straten, I. M. Svane, A.K. Sewell and G. Dolton (2015) Antibody stabilization of peptide-MHC multimers reveals functional T-cells bearing extremely low affinity TCRs. Journal of Immunology 194, 463-74.

Wooldridge L., M. Clement, A. Lissina, E. S. J. Edwards, K. Ladell, J. Ekeruche, R. E. Hewitt, B. Laugel, E. Gostick, D. K. Cole, R. Debets, C. Berrevoets, J. J. Miles, S. R. Burrows, D. A. Price, A. K. Sewell (2010) MHC Class I Molecules with Superenhanced CD8 Binding Properties Bypass the Requirement for Cognate TCR Recognition and Nonspecifically Activate CTLs. The Journal of Immunology. 184, 3357-3366.

Wooldridge L., J. Ekeruche-Makinde, H.A. van den Berg, A. Skowera, J.J. Miles, M.P. Tan, G. Dolton, M. Clement, S. Llewellyn-Lacey, D.A. Price, M. Peakman and A.K. Sewell (2012) A single autoimmune T-cell receptor recognises over a million different peptides. Journal of Biological Chemistry, 287, 1168-77.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Опухолеспецифический Т-клеточный рецептор (TCR), характеризующийся определяющими комплементарными участками, включающими или состоящими из CAYRSAVNARLMF (SEQ ID NO: 1) или CDR, который идентичен CDR3 α по крайней мере на 92%; CASSEARGLAFTDTQYF (SEQ ID NO: 2) или CDR, который идентичен CDR3 β по крайней мере на 92%; TSESDYY (SEQ ID NO: 3) в качестве CDR1 α ; ATEN (SEQ ID NO: 4) в качестве CDR2 α ; MGHDK (SEQ ID NO: 5) в качестве CDR1 β ; и SYGVNS (SEQ ID NO: 6) в качестве CDR2 β .

2. Опухолеспецифический Т-клеточный рецептор (TCR) по п.1, который не является TCR, который экспрессируется и связан с инвариантной, ассоциированной со слизистой оболочкой Т-клеткой (MAIT клеткой).

3. Опухолеспецифический Т-клеточный рецептор (TCR) по п.1 или 2, который представляет собой α -цепь, дополнительно включающую или состоящую из

AQTVTQSQPEMSVQEAETVTLCTYD**TSESDYY**LFWYKQPPSRQMILVIRQEAYKQQN**AT**
ENRFSVNFQKAAKSFLKISDSQLGDAAMY**FCA**YRSAVN**ARLMF**GDGTQLVVKPNIQNP
 DPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQKSDSVYITDKCVLDMRSMDFKNSAVAW
 SNKSDFAANAFNNSIIPEDTFFPSPESS (SEQ ID NO:7)

или α -цепь, которая идентична ей на по крайней мере 88%.

4. Опухолеспецифический Т-клеточный рецептор (TCR) по любому из пп.1-3, который представляет собой β -цепь, дополнительно включающую или состоящую из

EADYQTPRYLVIGTGKKITLCSQT**MGHDK**MYWYQQDPGMELHLIH**SYGVNS**TEKGD
 LSSESTVSRIRTEHFPLTLESARPSHTSQYL**CASSEARGLAFTDTQYF**GPGTRLTVLLEDLK
 NVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWVNGKEVHSGVCTDPQPLK
 EQPALNDSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVQVSAE
 AWGRAD (SEQ ID NO:8),

или β -цепь, которая идентична ей по крайней мере на 88%.

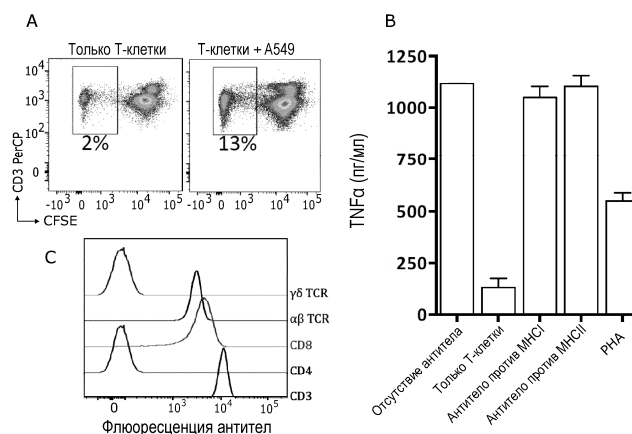
5. Опухолеспецифический Т-клеточный рецептор (TCR) по любому из пп.1-4, который является растворимым.

6. Опухолеспецифический Т-клеточный рецептор (TCR) по любому из пп.1-5, который является MR1-рестриктурированным.

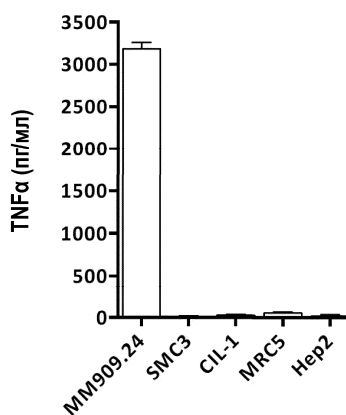
7. Т-клетка, экспрессирующая указанный TCR по любому из пп.1-6, модифицированная нуклеиновой кислотой, кодирующей TCR по любому из пп.1-6.

8. Клон Т-клетки, экспрессирующий указанный TCR по любому из пп.1-6, модифицированный нуклеиновой кислотой, кодирующей TCR по любому из пп.1-6.

9. Клон Т-клетки по п.8, который представляет собой клон MC.7.G5.
10. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую TCR по любому из пп.1-6.
11. Фармацевтическая композиция, содержащая указанный TCR по любому из пп.1-6, или указанную клетку по п.7, или указанный клон по п.8 или 9, или указанный вектор по п.10.
12. Биспецифическое моноклональное антитело, содержащее указанный TCR по любому из пп.1-6, а также активирующий иммунную клетку компонент или лиганд, который связывает и таким образом активирует иммунную клетку, такую как Т-киллер.
13. Способ лечения рака, включающий введение указанного TCR по любому из пп.1-6, или указанной клетки по п.7, или указанного клона по п.8 или 9, или указанного вектора по п.10, или указанной фармацевтической композиции по п.11 указанного биспецифического моноклонального антитела по п.12 индивидууму, подлежащему лечению.
14. Способ по п.13, в котором указанный рак выбран из группы, включающей или состоящей из колоректального рака, рака легкого, почки, предстательной железы, шейки матки, меланомы (кожи), рака кости, молочной железы, яичника или крови.
15. Способ по п.13 или 14, в котором указанный TCR, клетку, клон, вектор, фармацевтическую композицию или биспецифическое моноклональное антитело вводят в комбинации с противоопухолевым средством.
16. Применение указанного TCR по любому из пп.1-6, или указанной клетки по п.7, или указанного клона по п.8 или 9, или указанного вектора по п.10 для производства лекарственного средства для лечения рака.
17. Комбинированное терапевтическое средство для лечения рака, включающее:
 - а) указанный TCR по пп.1-6, или указанную клетку по п.7, или указанный клон по п.8 или 9, или указанный вектор по 10, или указанную фармацевтическую композицию по п.11, или указанное биспецифическое моноклональное антитело по п.12 в комбинации с
 - б) дополнительным противораковым терапевтическим средством.



Фиг. 1



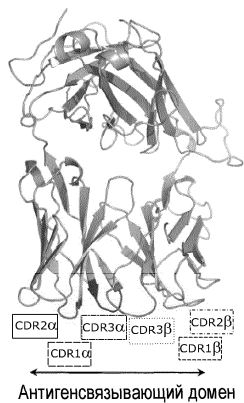
Фиг. 2

Альфа-цепь TRAV38.2/DV8 TRAJ31 TCR MC.7.G5
(CDR подчеркнуты жирным шрифтом)

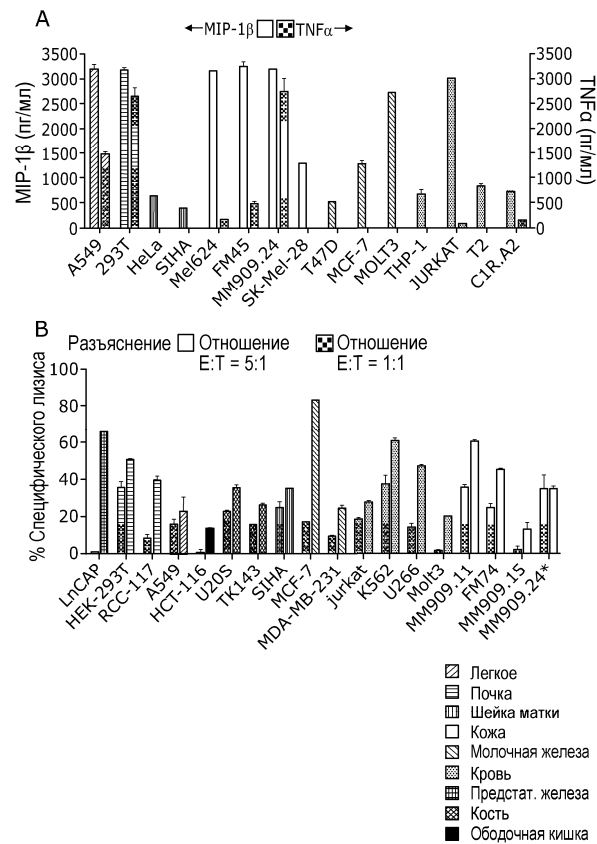
AQIVTQSQPEMSVQEAETVTL SCTYD **TSESDYY**LFWYKQPPSRQMILVIRQEAYKQQ
N **ATE**NRFSVNFQKAAKSFSLSKISDSQLGDAAMYI **CAYRS**AVNARLMF GDGTQLVV
KPNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDSVYITDKCVLDMRSM
DFKNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDITFFPSPESS

Бета-цепь TRBV25.1 TRBJ2.3 TCR MC.7.G5 (CDR подчеркнуты жирным шрифтом)

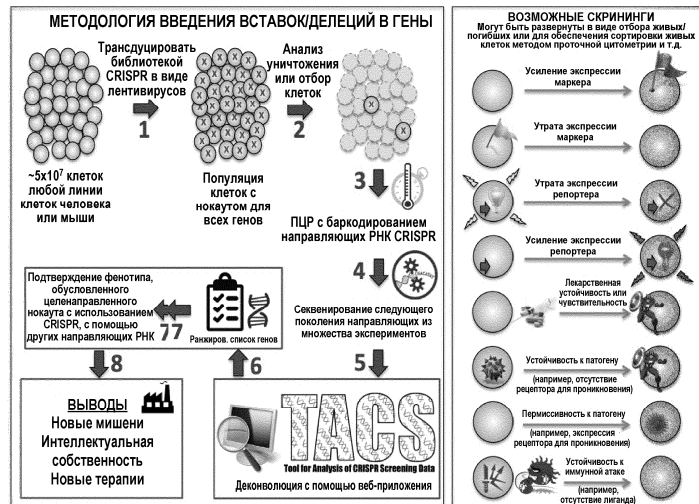
EADIIQTPRYLVIGTGKKITLESQT **MGHDK**MYWYQQDPGMELHLIH **SYGVNS**TE
KGDLSSESTVSRIRTEHFPLTLESARPSHTSQYL **CASSEARGLA**EFTD**TOYF**GPGRRLT
TVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVLSWWVNGKEVHS
GVCTDPQLKEQPALNDSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWT
QDRAKPVTDIVSAEAWGRAD



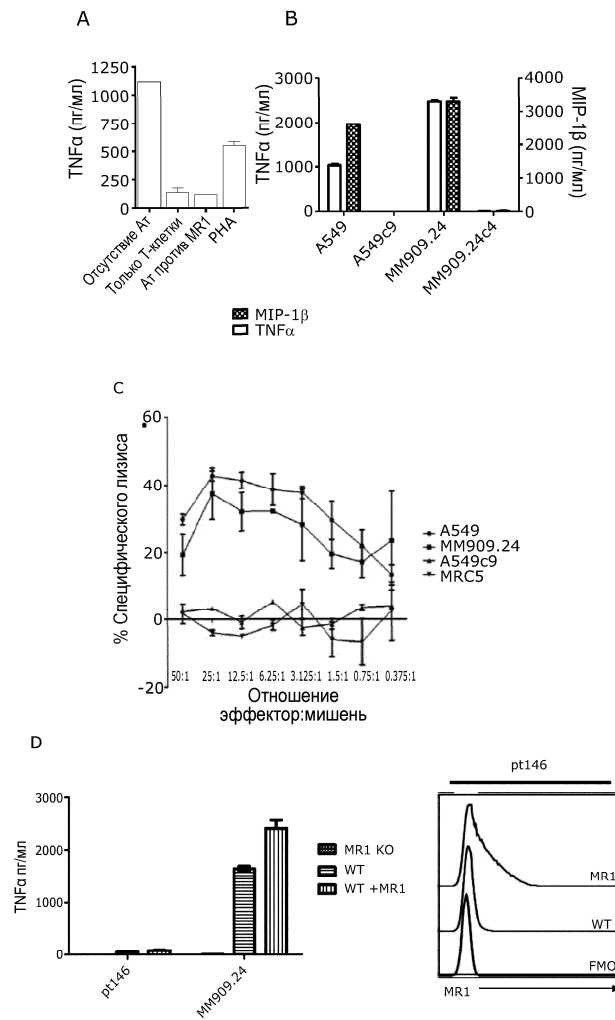
Фиг. 3



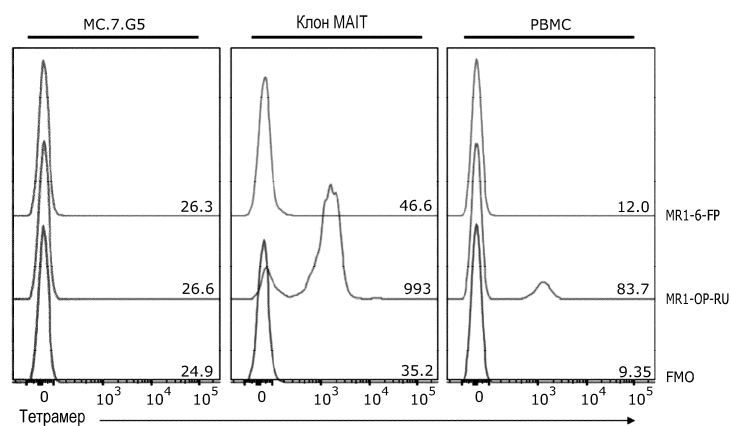
Фиг. 4



Фиг. 5

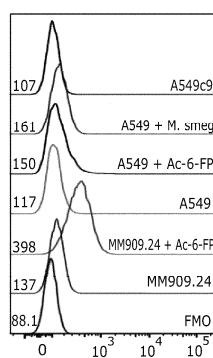


Фиг. 6

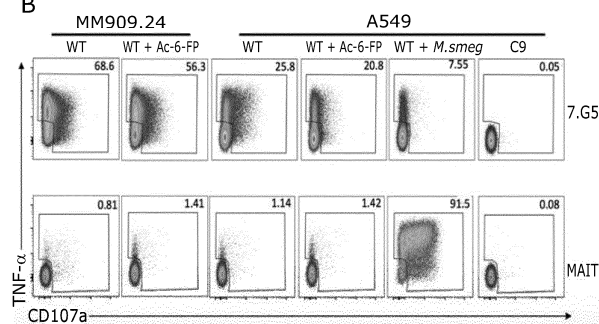


Фиг. 7

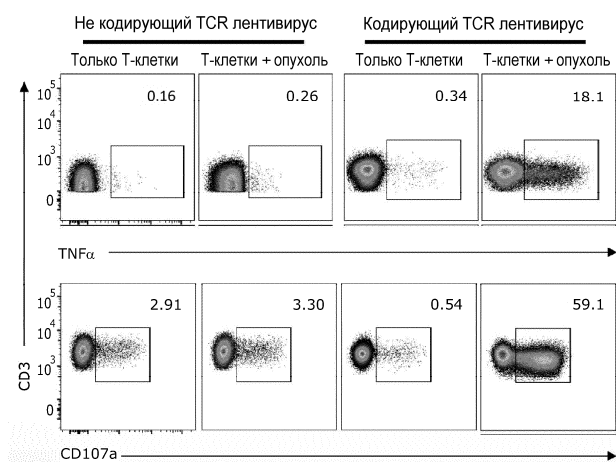
А



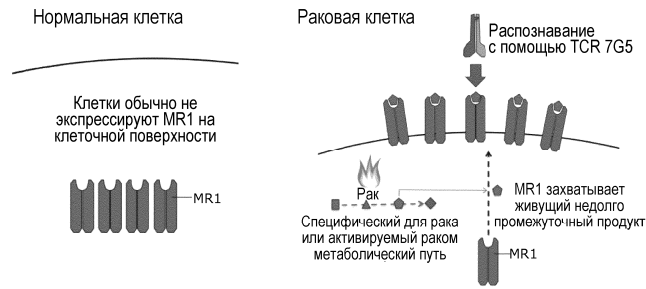
В



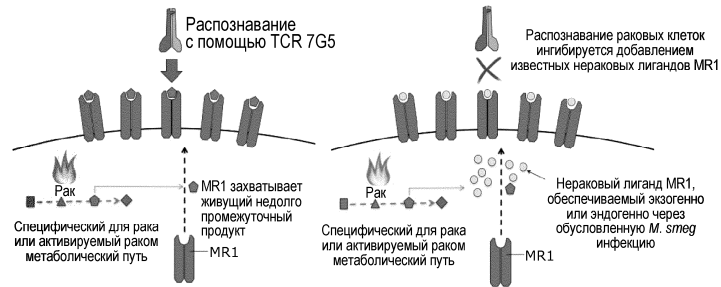
Фиг. 8



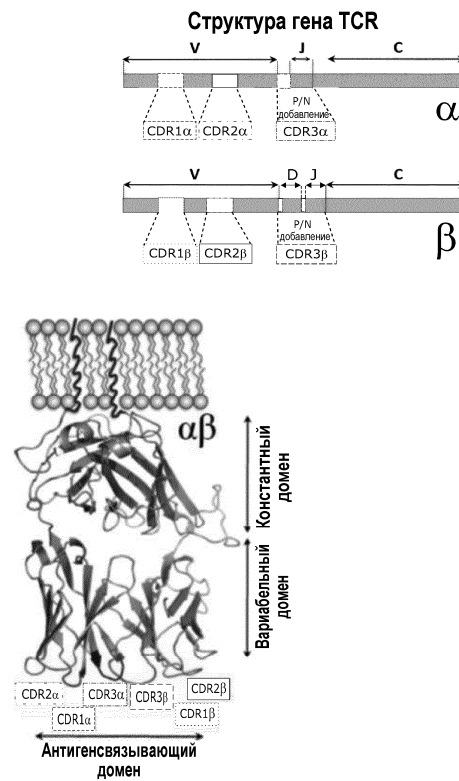
Фиг. 9



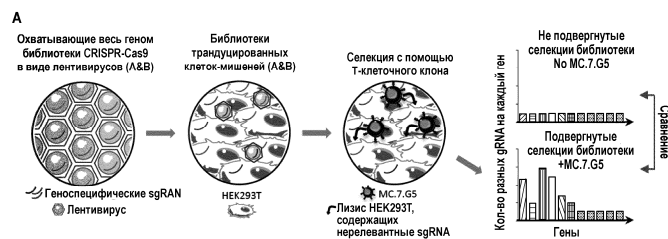
Фиг. 10

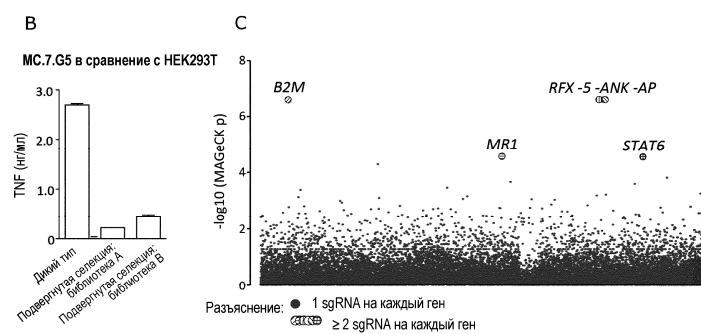


Фиг. 11

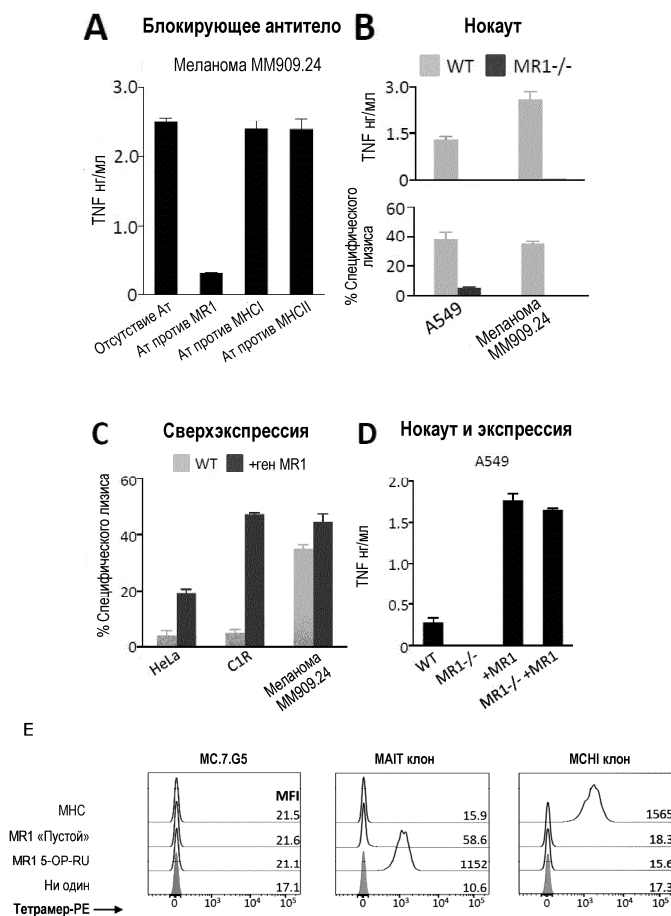


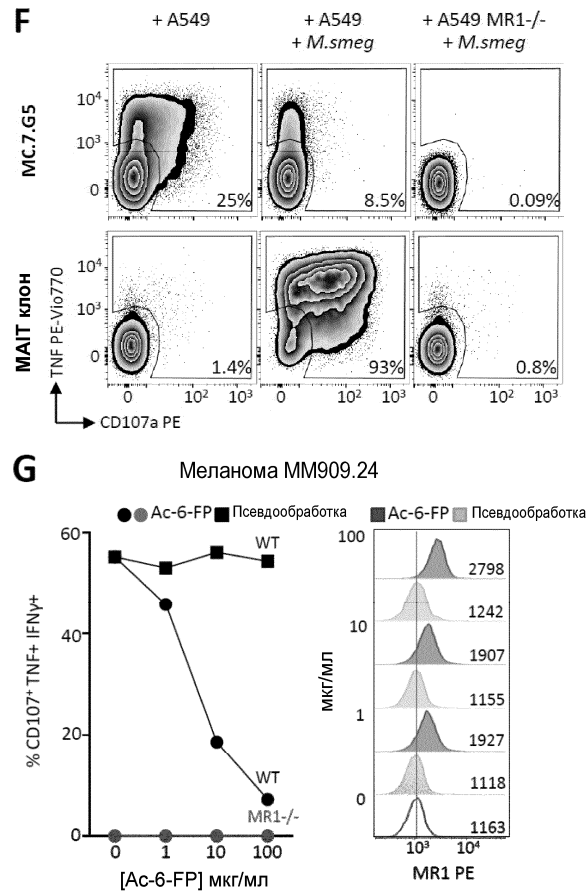
Фиг. 12



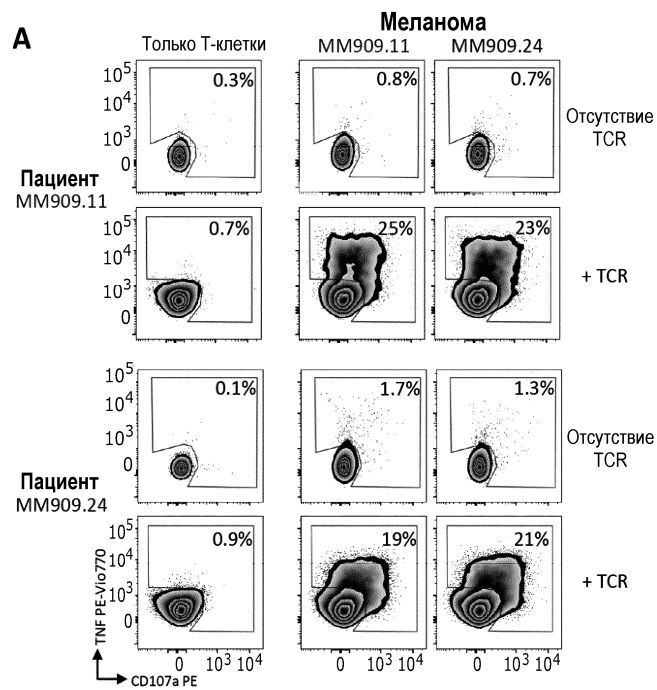


Фиг. 13

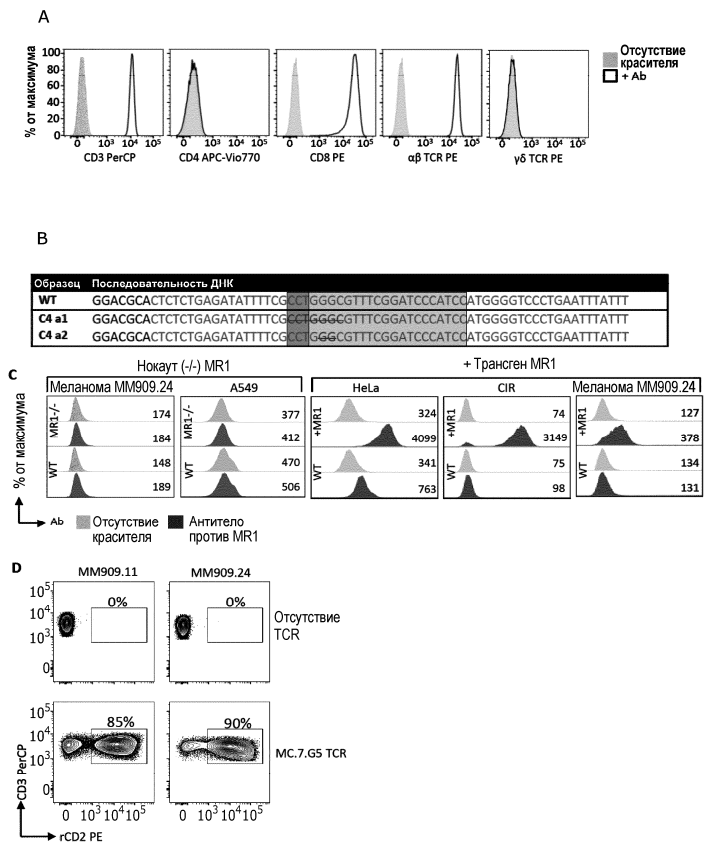




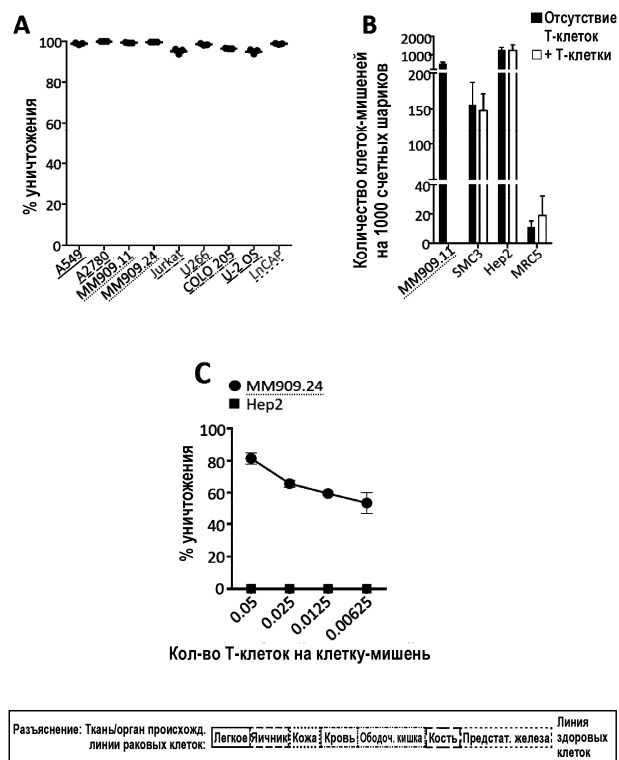
Фиг. 14



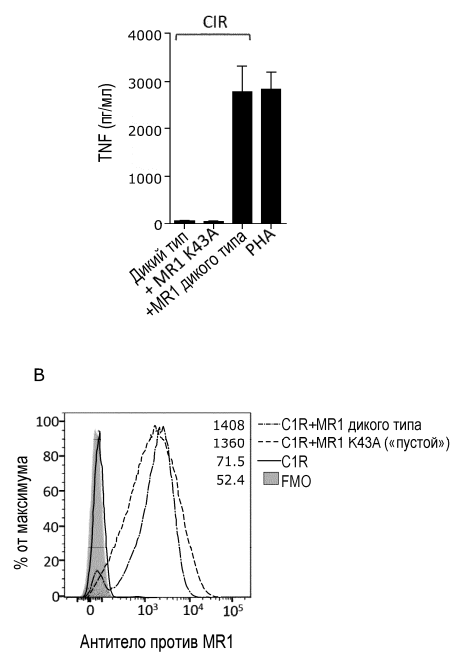
Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18

