

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290262 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.09.28

(51) Int. Cl. G01N 33/569 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.08.12

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХАРАКТЕРИСТИК СВЯЗЫВАЮЩИХ ПЕПТИД:МНС ПОЛИПЕПТИДОВ

(31) 10 2019 121 834.9; 62/886,225

(32) 2019.08.13

(33) DE; US

(86) PCT/EP2020/072674

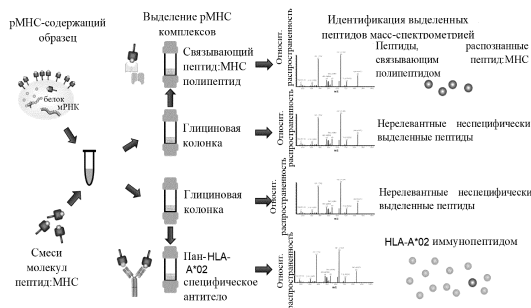
(87) WO 2021/028503 2021.02.18

(71) Заявитель:
ИММАТИКС БАЙОТЕКНОЛОДЖИЗ
ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:
Шустер Хайко, Хутт Майке,
Вайншенк Тони, Бунк Себастиан,
Шор Оливер, Бакерт Линус, Хофманн
Мартин, Фритше Йенс, Унвердорбен
Феликс, Шиммак Гизела, Швёер
Флориан (DE)

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

(57) Настоящее изобретение относится к способу определения характеристик связывающих пептид:МНС полипептидов, например с помощью масс-спектрометрии и анализа распознанного пептидного пространства, т.е. для идентификации пептидов, которые могут быть связаны в контексте их презентирования МНС, и пептидов, которые не могут быть связаны.



A1

202290262

202290262

A1

СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХАРАКТЕРИСТИК СВЯЗЫВАЮЩИХ ПЕПТИД:МНС ПОЛИПЕПТИДОВ

ОПИСАНИЕ

Настоящее изобретение относится к способу определения характеристик связывающих пептид:МНС полипептидов, например с помощью масс-спектрометрии и анализа распознанного пептидного пространства, т.е. для идентификации пептидов, которые могут быть связаны в контексте их презентирования МНС, и пептидов, которые не могут быть связаны.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Иммунотерапия заняла видное место в области онкологии и доказала свою ценность при лечении различных типов опухолей. Диапазон иммунотерапии варьируется от химерных антигенных рецепторов (CAR), размножающихся инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) и эффекторных клеток, трансдуцированных Т-клеточным рецептором (TCR). В различных исследованиях успешно используют Т-клетки с сконструированными TCR для усиления приобретенных иммунных ответов пациентов против злокачественных новообразований, демонстрируя мощную противоопухолевую реактивность. Однако эффективность генетически модифицированных Т-клеток против рака значительно повышается за счет повышенной токсичности.

Нецелевая токсичность возникает, когда популяция трансдуцированных Т-клеток неожиданно атакует антиген, отличный от предполагаемого, или активирует себя независимо от своей специфичности.

В US 2018/0125889 указано, что гамма-дельта Т-клетка может быть сконструирована для экспрессии ингибирующего CAR, который минимизирует активацию в клетках, не являющихся мишенями, например неопухолевых клетках, в которых клеточная поверхность-мишень представляет собой опухоль-ассоциированный, но не опухолеспецифический антиген. В WO 2018/053374 описан способ скрининга Т-клеточных эпитопов для прогнозирования или изучения токсичности и/или нецелевых эффектов Т-клеток, TCR или TCR-подобных молекул, включая в себя приведение в контакт со сконструированной клеткой-мишенью или популяцией сконструированных целевых клеток с Т-клеткой, TCR или TCR-подобной молекулой и выполнение анализа для определения, связывается ли Т-клетка, TCR или TCR-подобная молекула со сконструированной целевой

клеткой или популяцией сконструированных целевых клеток и/или для измерения силы любого такого связывания.

Vijen с соавт. (Vijen *et al.*, 2018) обнаружили нецелевое распознавание клоном Т-клеток 7B5 фибробластов и кератиноцитов человека, которые не экспрессируют антиген HA-2. Vijen с соавт. раскрывают подход к сканированию комбинаторной библиотеки пептидов для идентификации нецелевого пептида, т.е. пептида, производного от CDH13, распознаваемого клоном Т-клеток 7B5.

По-прежнему существует потребность в снижении нецелевой токсичности в иммунотерапии.

Существуют два класса молекул МНС. МНС I или II, которые можно найти на большинстве ядерных клеток. Молекулы МНС состоят из альфа-тяжелой цепи и бета-2-микроглобулина (рецепторы МНС класса I) или альфа- и бета-цепи (рецепторы МНС класса II) соответственно. Их трехмерная конформация приводит к образованию связывающей бороздки, которая обеспечивает нековалентное взаимодействие со специфическими пептидами.

Рецепторы МНС класса I представляют собой пептиды, которые являются результатом протеолитического расщепления преимущественно эндогенных белков, дефектных рибосомных частиц (DRIP) и более крупных пептидов. Рецепторы МНС класса II могут быть обнаружены преимущественно на профессиональных антигенпрезентирующих клетках (APC) и в основном представляют собой пептиды экзогенных или трансмембранных белков, которые захватываются APC в ходе эндоцитоза и впоследствии подвергаются процессированию.

Комплексы пептида и молекул МНС класса I распознаются CD8-положительными цитотоксическими Т-лимфоцитами, несущими соответствующий Т-клеточный рецептор (TCR), тогда как комплексы пептида и молекул МНС класса II распознаются CD4-положительными вспомогательными Т-клетками, несущими соответствующий TCR. Хорошо известно, что во время этого процесса распознавания TCR, пептид и МНС присутствуют и образуют комплекс в стехиометрическом количестве 1:1:1.

Чтобы пептид запускал (вызывал) клеточный иммунный ответ, он должен связываться с молекулой МНС. Этот процесс зависит от аллеля молекулы МНС и конкретных полиморфизмов аминокислотной последовательности пептида. Пептиды, связывающие МНС класса I, как правило, характеризуются длиной 8-12 аминокислот и, как правило, содержат по меньшей мере два консервативных остатка («якорные остатки», AR) в своей последовательности, которые взаимодействуют с соответствующей связывающей бороздкой молекулы МНС. Таким образом, каждый аллель МНС содержит мотив

связывания, который контролирует способность пептидов специфически связываться со связывающей бороздкой. Таким образом, каждый аллель МНС характеризуется мотивом связывания, который контролирует способность пептидов специфически связываться со связывающей бороздкой. Тем не менее, как упоминалось выше, в зависимом от МНС класса I иммунном ответа пептиды не только должны быть способны связываться с определенными молекулами МНС класса I, экспрессируемыми опухолевыми клетками, но также должны распознаваться Т-клетками, несущими специфические Т-клеточные рецепторы (TCR). Антигены, которые распознаются опухолеспецифическими цитотоксическими Т-лимфоцитами, то есть их эпитопы, могут представлять собой молекулы (пептиды), происходящие из всех классов белков, таких как ферменты, рецепторы, факторы транскрипции и т.д., которые экспрессируются и, по сравнению с неизменными клетками того же происхождения, положительно регулируются в клетках соответствующей опухоли.

Многие виды иммунотерапии рака, которые в настоящее время разрабатываются, основаны на введении связывающих пептид:МНС полипептидов субъекту в форме молекулы растворимого полипептида или переноса клеток, предпочтительно Т-клеток, экспрессирующих такие полипептиды в виде мембраносвязанных молекул.

Хотя фактическая последовательность целевых пептидов для таких связывающих пептид:МНС полипептидов, как правило, установлена/определена, может существовать неизвестное количество дополнительных пептидов, с которыми эти молекулы могут связываться. Эти так называемые «нецелевые пептиды» представляют собой значительный риск безопасности для применения *in vivo* из-за потенциально серьезных побочных эффектов. Причиной этих побочных эффектов, как правило, является презентирование таких нецелевых пептидов на здоровых тканях, отличных от раковой ткани, и ранее сообщалось о соответствующих летальных исходах (см., например, (Linette et al., 2013)).

Кроме того, имеются отчеты о клинических случаях проблем и потенциально смертельных серьезных побочных эффектов при введении Т-клеток, трансдуцированных определенными неоптимизированными Т-клеточными рецепторами (van den Berg *et al.*, 2015), а также рецепторами, нацеленными на Mage-A4 и Mage-A10 (продукты Adaptimmune ADP-A2M4 и ADP-A2M10).

Следовательно, точное знание об идентичности этих нецелевых пептидов, а также их значимости для безопасности имеет самое большое значение для правильной разработки видов иммунотерапии рака, включающих в себя связывающие пептид:МНС полипептиды.

Современные стратегии идентификации таких пептидов включают в себя поиск в базах данных белковых последовательностей пептидов, сходных с целевым пептидом. Эти

подходы, как правило, приводят к большому количеству, потенциально десятков тысяч пептидов, в зависимости от применяемых параметров поиска, все из которых должны быть протестированы в последующих анализах на их способность связываться с соответствующими связывающими пептид:МНС полипептидами. Модификация этих поисков путем интеграции дополнительных характеристик связывающего пептид:МНС полипептида, таких как данные мутационного сканирования, потенциально может уменьшить количество пептидов, которые необходимо тестировать в последующих анализах, но все же не дает никакой информации о том, презентированы ли эти пептиды также молекулами МНС в физиологических условиях и, следовательно, по-прежнему представляют значительный риск для безопасности при применении *in vivo*.

Кроме того, все эти подходы требуют определенных предположений о том, как оценивается сходство с целевой последовательностью или какие аминокислоты допускаются в определенных положениях пептидной последовательности на основании данных мутационного сканирования. Пептиды, которые не соответствуют этим предположениям, например, из-за того, что их способ связывания с молекулой МНС или связывающий пептид:МНС полипептид отличается от таковых для целевой пептидной последовательности, не могут быть идентифицированы с помощью этих подходов. Это особенно актуально для пептидов, длина которых отличается от длины целевого пептида (например, ненамерный нецелевой пептид от декамерного целевого пептида), который может характеризоваться совершенно другой аминокислотной последовательностью, не относящейся к целевой последовательности (Ekeruche-Makinde *et al.*, 2013).

Ввиду вышеизложенного в настоящей области техники существует потребность в эффективных способах идентификации целевых эпитопов ТСR с целью максимально приблизиться к ситуации *in vivo*. Кроме того, для этого требуется идентификация «нецелевых» эпитопов, которые перекрестно реагируют с анализируемыми ТСR (или ТСR-подобными молекулами), чтобы можно было разработать терапевтические препараты, которые не только высокоспецифичны, но и не нацелены на нормальную здоровую ткань.

Следовательно, весьма желательно предоставить альтернативный и более прямой способ идентификации соответствующих связывающихся с МНС пептидов, которые связываются или распознаются связывающим пептид:МНС полипептидом, избегая использования неточных алгоритмов прогнозирования и громоздких испытаний потенциально от сотен до тысяч потенциальных нецелевых пептидов. Таким образом, целью настоящего изобретения является предоставление такого способа определения характеристик связывающих пептид:МНС полипептидов для идентификации нецелевых пептидов (т.е. лигандов, презентированных МНС), которые могут связываться этими

молекулами всеобъемлющим и прямым способом. Другие цели и преимущества настоящего изобретения станут очевидными для специалиста при изучении нижеследующего описания, как представлено далее.

Согласно первому аспекту настоящего изобретения цель настоящего изобретения решается с помощью способа определения характеристик связывания молекулы полипептида, содержащей по меньшей мере один определенный пептидсвязывающий домен («pMHC-связывающий полипептид»), с пептидом («целевой пептид») комплекса пептид:MHC, предусматривающего следующее:

а) получение образца, содержащего по меньшей мере один анализируемый комплекс пептид:MHC,

б) приведение в контакт указанного образца с указанной молекулой полипептида («pMHC-связывающий полипептид») и обеспечение возможности связывания указанного по меньшей мере одного пептидсвязывающего домена указанной молекулы полипептида с указанным по меньшей мере одним комплексом пептид:MHC,

с) выделение указанного по меньшей мере одного комплекса пептид:MHC, связанного с указанным по меньшей мере одним пептидсвязывающим доменом, и

д) идентификация указанного пептида указанного по меньшей мере одного комплекса пептид:MHC, выделенного на стадии с), и тем самым идентификация связывания указанной молекулы полипептида с указанным пептидом указанного по меньшей мере одного комплекса пептид:MHC.

Согласно одному варианту осуществления аминокислотная последовательность указанного пептидсвязывающего домена представляет собой или происходит от Т-клеточного рецептора (TCR), полипептида, подобного Т-клеточному рецептору, и/или антитела или его собственно связывающего домена.

Используемый в настоящем документе термин «полипептидная молекула, содержащая по меньшей мере один определенный пептидсвязывающий домен» используется взаимозаменяемо с термином «pMHC-связывающий полипептид».

Такой pMHC-связывающий полипептид представляет собой, например, антитело или его функциональный фрагмент или производное, как описано в другом месте в настоящем документе, или Т-клеточный рецептор (также называемый «TCR» в настоящем документе), предпочтительно растворимый Т-клеточный рецептор или его функциональный фрагмент или производное, как раскрыто в другом месте в настоящем документе.

Термин «определенный пептидсвязывающий домен» в связывающем полипептиде относится, например, к переменным доменам тяжелой и легкой цепи антитела или переменным доменам α - и β -субъединицы TCR.

Термин «определенный пептидсвязывающий домен» в связывающем полипептиде может также относиться по меньшей мере к одной определяющей комплементарности области (также называемой «CDR» в настоящем документе) по меньшей мере одного переменного домена антитела или TCR. Используемый в настоящем документе термин «пептид» в комплексе пептид:МНС используется взаимозаменяемо с термином «целевой пептид».

Термин «комплекс пептид:МНС» может быть сокращен как «комплекс рМНС» или даже «рМНС».

Согласно одному варианту осуществления в заявленном способе молекула полипептида необязательно прикреплена к матричному материалу и/или при этом указанная молекула полипептида дополнительно содержит по меньшей мере один сайт прикрепления, связывающийся с матричным материалом или прикрепленный к нему.

Важно отметить, что этот вариант осуществления относится только к способу как таковому, в котором молекула полипептида характеризуется, например, перекрестной реактивностью. Как обсуждается в другом месте настоящего документа, молекула полипептида сама по себе может быть растворимой.

Согласно одному варианту осуществления определение характеристик связывания молекулы полипептида с пептидом комплекса пептид:МНС предусматривает идентификацию связывания молекулы полипептида с указанным пептидом комплекса пептид:МНС.

Согласно другому предпочтительному аспекту в настоящем раскрытии представлены способы идентификации нецелевого пептида комплекса нецелевой пептид:МНС, способного связываться с определенным Т-клеточным рецептором (TCR) и/или пептидсвязывающим доменом антитела, включая в себя, пример, следующее:

а) получение образца, например клеточного лизата, содержащего комплекс нецелевой пептид:МНС, где указанный образец не обязательно содержит комплекс целевой пептид:МНС, определяющий пептидсвязывающие свойства пептида указанного пептидсвязывающего домена,

б) аффинная очистка указанного образца, предусматривающая приведение указанного образца в контакт с полипептидом, необязательно связанным или прикрепленным к матричному материалу, причем указанный полипептид содержит по меньшей мере один пептидсвязывающий домен, связывающийся с указанным комплексом

целевой пептид:МНС, и где указанный полипептид представляет собой Т-клеточный рецептор (TCR) и/или антитело, которое связывается с целевым пептидом указанного комплекса целевой пептид:МНС,

с) выделение указанного комплекса нецелевой пептид:МНС, связанного с указанным по меньшей мере одним пептидсвязывающим доменом; и

д) идентификация указанного нецелевого пептида указанного по меньшей мере одного комплекса нецелевой пептид:МНС, выделенного на стадии с).

В контексте настоящего изобретения указанный образец можно выбрать из любого подходящего природного или искусственного образца, содержащего по меньшей мере один анализируемый комплекс пептид:МНС, такого как клеточный лизат, или образец, содержащий очищенный(ые) или обогащенный(ые) комплекс(ы) пептид:МНС. Состав/свойства комплекса(ов) пептид:МНС, а также концентрация/количество молекул могут быть известны или неизвестны. Одним из примеров образца является библиотека комплексов пептид:МНС, где последовательности пептидов, как они связаны, являются определенными и/или сходными по своей длине и аминокислотным последовательностям.

Согласно одному варианту осуществления молекула полипептида, содержащая указанный по меньшей мере один пептидсвязывающий домен, не обладает дополнительной специфичностью связывания, т.е. она является моноспецифической для пептида или комплекса пептид:МНС.

Согласно различным вариантам осуществления способа согласно настоящему изобретению молекула полипептида, содержащая указанный по меньшей мере один пептидсвязывающий домен, выбрана из биспецифических, триспецифических, тетраспецифических или мультиспецифических молекул.

Термин «биспецифический» в контексте способа согласно настоящему изобретению относится к молекуле полипептида по меньшей мере с двумя валентностями и специфичностями связывания для двух разных антигенов и, таким образом, содержит два антигенсвязывающих сайта. В соответствии с настоящим изобретением один из этих антигенсвязывающих сайтов представляет собой определенный пептидсвязывающий домен. Термин «валентность» относится к количеству сайтов связывания молекулы полипептида, например, двухвалентный полипептид относится к полипептиду, который содержит два сайта связывания. Следует отметить, что термин «валентность» относится к количеству сайтов связывания, при этом эти сайты связывания могут связываться с одними и теми же или разными мишенями, т.е. молекула двухвалентного полипептида может быть моноспецифической, т.е. связывающей одну мишень, или биспецифической, т.е. связывающей две разные мишени.

Связывающий пептид:МНС полипептид в этом случае представляет собой или происходит от Т-клеточного рецептора (TCR), полипептида, подобного Т-клеточному рецептору, и/или антитела, или фрагмента этих молекул, которые способны связывать или опосредовать связывание указанной молекулы со специфическими/определенными комплексами пептид:МНС.

По меньшей мере один пептидсвязывающий домен может представлять собой или происходить от молекулы, выбранной из следующего: антитело, биспецифическое антитело с одновременным множественным взаимодействием с Т-клетками (SMITE), биспецифический активатор Т-клеток (BiTE), scFV, диатело, переориентирующееся антитело с двойной аффинностью (DART), тандемное антитело (TandAb), растворимый TCR, scTCR, мутированный TCR, например, содержащий S-мостики, усеченный TCR и слитая молекула биспецифического Т-клеточного рецептора (TCR) и антитела.

В одном примере по меньшей мере один пептидсвязывающий домен может представлять собой антитело или может происходить от антитела.

В контексте настоящего изобретения «определенный» или «определяющий» связывающий пептид:МНС полипептид должен означать полипептид (составляющий или содержащий связывающий домен), который связывается с выбранным («нацеленным») пептидом МНС в контексте МНС. Согласно предпочтительному варианту осуществления указанное связывание связывающего пептид:МНС полипептида с выбранным пептидом МНС происходит с наивысшей аффинностью и/или селективностью по сравнению с другими (известными) пептидами МНС.

Используемые в контексте настоящего изобретения примеры представляют собой определенный связывающий пептид:МНС полипептид согласно примерам 1, 3, 4 и 5, демонстрирующий аффинность к пептиду PRAME-004 SLLQHLIGL (SEQ ID NO: 1), и определенный связывающий пептид:МНС полипептид согласно примеру 2, который демонстрирует повышенную аффинность к пептиду, производному от MAGEA4/A8, с последовательностью KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 24), который в настоящем документе также называется пептидом MAGEA4/8.

Связывание определенного связывающего пептид:МНС полипептида может включать в себя связывание с целевым пептидом в контексте МНС или связывание как с целевым пептидом, так и с полипептидом МНС.

Хотя в последние годы были описаны некоторые способы скрининга TCR и TCR-подобных молекул против пептидных лигандов, на сегодняшний день такие способы имеют ограниченный успех. Например, Birnbaum с соавт. разработали библиотеку комплексов пептид:МНС («pMHC») дрожжевого дисплея из $\sim 2,1 \times 10^8$ минигенов антигенов (Birnbaum

et al., 2014). Используя систему Birnbaum, клетки, которые связывались с растворимыми TCR, очищали с помощью магнитных шариков и затем подвергали высокопроизводительному секвенированию. После четырех раундов отбора были идентифицированы сотни пептидов, которые были перекрестно реактивными с пятью различными TCR мыши. Однако исходные эпитопы, с которыми, как известно, связываются TCR, не были обнаружены.

Согласно настоящему изобретению предпочтительно используют связывающие пептид:МНС полипептиды для выделения или обогащения специфических молекул пептид:МНС из смеси органических молекул, таких как пептиды и белки (например, белковые лизаты, полученные из тканей или клеточных линий, библиотеки рекомбинантно продуцируемых молекул пептид:МНС) и, например, последующую масс-спектрометрию для анализа выделенных молекул пептид:МНС и для идентификации последовательности связанных пептидов.

Настоящий способ характеризуется рядом преимуществ по сравнению со способами, известными из уровня техники, которые можно обозначить как «подходы прогнозирования нецелевых пептидов».

Для фактической идентификации нецелевых связывающих агентов в подходах прогнозирования используется связывающий мотив для прогнозирования большого перечня пептидов с последующим трудоемким тестированием *in vitro*. В настоящем изобретении возможна прямая идентификация по образцам, таким как клеточные лизаты. Это не требует громоздкого тестирования предсказанных пептидов в анализах *in vitro*. Кроме того, было обнаружено, что этот способ очень чувствителен, так что можно идентифицировать даже слабо перекрестно-распознаваемые пептиды.

В подходах прогнозирования идентификация источника неизвестных нецелевых распознаваний невозможна. В отличие от этого согласно настоящему изобретению это возможно путем создания образца, например лизата, и использования указанного лизата в экспериментах по аффинной хроматографии со связывающим пептид:МНС полипептидом.

В подходах прогнозирования образование связывающего мотива выводится из данных позиционного сканирования, тогда как в настоящем изобретении оно выводится из идентифицированных нецелевых пептидов, и дополнительно учитываются множественные замены в различных положениях в аминокислотной последовательности пептида(ов) без необходимости предварительного тестирования *in vitro*.

Кроме того, представленный способ не ограничивается анализом специфического аллотипа HLA (например, HLA-A*02:01) и может также использоваться для идентификации нецелевых пептидов, презентрированных различными аллотипами HLA.

Эти аллореактивности трудно оценить с помощью существующих в настоящее время стандартных подходов, и они не поддаются способам прогнозирования.

Наконец, что касается вариантов длины и модификаций пептидных последовательностей, в анализе прогнозирования невозможно прогнозирование вариантов длины или встречающихся в природе модификаций пептидов, настоящий анализ позволяет осуществлять прямую идентификацию всех вариантов длины и встречающихся в природе модификаций пептидов, таких как, например, фосфорилирования и гликозилирования.

Согласно одному варианту осуществления настоящий способ специфически и надежно идентифицирует пептиды, связанные связывающими пептид:МНС полипептидами, предусматривая обогащение или выделение молекул пептид:МНС, распознаваемых указанными связывающими пептид:МНС полипептидами из смесей молекул пептид:МНС, полученных из биологических образцов или биотехнологического производства, и идентификацию обогащенных/выделенных молекул пептид:МНС, например с помощью масс-спектрометрии и последующего тестирования идентифицированных пептидов на их способность связываться с одними и теми же связывающими пептид:МНС полипептидами *in vitro*.

Предпочтительным является способ согласно настоящему изобретению, при котором указанная молекула полипептида, содержащая указанный по меньшей мере один пептидсвязывающий домен, связывающийся с комплексом пептид:МНС, выбрана из биспецифических, триспецифических, тетраспецифических или мультиспецифических молекул.

Еще одним предпочтительным является способ согласно настоящему изобретению, при котором указанная молекула полипептида, содержащая указанный по меньшей мере один пептидсвязывающий домен, представляет собой биспецифическую молекулу, содержащую пептидсвязывающий домен, который происходит от Т-клеточного рецептора (TCR).

Согласно другому аспекту полипептид, содержащий указанный по меньшей мере один пептидсвязывающий домен, связывающийся с комплексом целевой пептид:МНС, может представлять собой биспецифические молекулы, содержащие связывающий домен, который происходит от Т-клеточного рецептора (TCR).

Согласно другим аспектам описанные в настоящем документе способы могут дополнительно предусматривать выбор набора полипептидов, которые различаются по своим связывающим свойствам.

Преимущественно представленный способ, описанный в независимом пункте формулы изобретения, не обязательно требует определения связывающих мотивов путем

замены отдельных аминокислот в отдельных положениях целевого пептида с последующим тестированием распознавания этих вариантов пептида в функциональных анализах с последующим прогнозированием потенциальных нецелевых пептидов на основе указанных связывающих мотивов с использованием баз данных протеома человека и последующего тестирования этих (потенциально) больших количеств пептидов в анализах *in vitro*, как объяснено выше.

Согласно другому аспекту описанные в настоящем документе способы предпочтительно уменьшают количество идентифицированных нецелевых пептидов по меньшей мере в 2 раза, предпочтительно по меньшей мере в 5 раз и наиболее предпочтительно по меньшей мере в 10 раз по сравнению с подходами, основанными на прогнозировании, путем сосредоточения внимания на соответствующих пептидах, которые презентированы в биологическом образце соответствующим аллотипом HLA, как объяснено выше и в сравнительных примерах в настоящем документе.

Согласно другому аспекту по меньшей мере один связывающий домен может содержать детектируемый маркер или метку.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения перекрестная реактивность для указанного связывающего пептид:МНС домена дополнительно исследуется по меньшей мере в одном эксперименте по цитотоксичности. Это можно сделать, например, с помощью клеток T2, нагруженных соответствующими пептидами, которые инкубируют совместно с CD8+ Т-клетками человека (50000 клеток на лунку) в присутствии указанных концентраций PRAME-004-специфического связывающего пептид:МНС полипептида (см. фигуру 4 и соответствующее описание в другом месте в настоящем документе).

Настоящее изобретение также может относиться к набору, содержащему материалы для выполнения способа, включая в себя а) материал, такой как матричный материал, описанный в настоящем документе, и б) полипептид, содержащий по меньшей мере один связывающий домен, связывающийся с комплексом целевой пептид:МНС.

Настоящее изобретение также относится к молекуле полипептида, содержащей по меньшей мере один определенный пептидсвязывающий домен («pMHC-связывающий полипептид»), причем связывание которой с пептидом («целевой пептид») комплекса пептид:МНС охарактеризовано с помощью способа по любому из пп. 1-29.

Такая молекула полипептида может представлять собой антитело или Т-клеточный рецептор, или модифицированный формат, как обсуждается в контексте способа в другом месте в настоящем документе.

Такая молекула полипептида может являться моно-, би- или мультиспецифической, как обсуждается в контексте способа в другом месте в настоящем документе.

Такая молекула полипептида может являться растворимой, как обсуждается в контексте способа в другом месте в настоящем документе.

Такая молекула полипептида может характеризоваться аффинностью к пептиду («целевой пептид») комплекса пептид:МНС или к комплексу пептид:МНС, составляющей $KD < 500$ нМ.

Все предпочтительные варианты осуществления молекулы полипептида, обсуждаемые в контексте способа, также применимы в настоящем документе и не будут повторяться в целях экономии.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу получения популяции клеток, экспрессирующих конструкт, распознающий мишень-специфический антиген, предусматривающему получение клетки-хозяина, получение конструкта, распознающего мишень-специфический антиген, содержащего кодирующую последовательность, кодирующую второй полипептид, введение в указанную клетку-хозяин указанного конструкта, распознающего мишень-специфический антиген, и экспрессию указанного конструкта, распознающего мишень-специфический антиген, клеткой-хозяином. Согласно другому аспекту экспрессия может включать в себя презентирование конструкта, распознающего антиген, на поверхности клетки.

Согласно другому аспекту конструкт, распознающий мишень-специфический антиген, может представлять собой экспрессионный конструкт, содержащий промоторную последовательность, функционально связанную с указанной кодирующей последовательностью. Согласно еще одному аспекту конструкт, распознающий мишень-специфический антиген, может иметь происхождение от млекопитающих, необязательно от человека. Конструкт, распознающий мишень-специфический антиген, может дополнительно представлять собой модифицированный TCR, причем указанная модификация содержит добавление функционального домена, содержащего метку, или альтернативного домена, содержащего мембранный якорный домен.

Согласно другому аспекту конструкт, распознающий мишень-специфический антиген, может представлять собой альфа/бета TCR, гамма/дельта TCR или одноцепочечный TCR (scTCR). Согласно другому аспекту конструкт, распознающий мишень-специфический антиген, можно вводить в указанную подходящую клетку-хозяин посредством ретровирусной трансдукции. Согласно еще одному аспекту способы, описанные в настоящем документе, могут дополнительно предусматривать выделение и очистку конструкта, распознающего мишень-специфический антиген, из клетки-хозяина и,

необязательно, восстановление конструктора, распознающего мишень-специфический антиген, в Т-клетке.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к популяции клеток, в частности Т-клеток, продуцируемой способами согласно настоящему изобретению.

Ожидается, что конструкторы, распознающие мишень-специфический антиген, и клетки, в частности Т-клетки, полученные способами согласно настоящему изобретению, будут проявлять улучшенные свойства при лечении заболеваний, при этом указанное лечение включает в себя иммунотерапию. Из-за того факта, что настоящий способ напоминает ситуацию, более близкую/более похожую на ситуацию *in vivo*, будут встречаться меньше нецелевых эффектов и побочных эффектов. Это имеет преимущества для медицинского и клинического использования; в ходе клинических испытаний модифицированного анти-MAGE-A3 TCR, полученного в результате иммунизации трансгенных мышей HLA-A*02:01, у двух из девяти онкологических пациентов развилась фатальная, специфическая в отношении мишени, неврологическая токсичность из-за распознавания пептида, происходящего из то же семейства генов, которое экспрессируется в головном мозге (Morgan *et al.*, 2013).

В другом испытании, в котором анти-MAGE-A3 TCR с повышенной аффинностью тестировали на пациентах с миеломой и меланомой, два пациента умерли от неспецифической в отношении мишени токсичности, вызванной распознаванием совершенно другого пептида, что привело к серьезному повреждению миокарда (Linette *et al.*, 2013; Raman *et al.*, 2016). Эти клинические случаи показывают, насколько сложно предсказать точную специфичность и результирующие эффекты TCR, которые не прошли оптимальную селекцию в тимусе. Крайне важно разработать стратегии для всесторонней проверки точной специфичности TCR, особенно потому, что Т-клетки с сконструированными TCR являются очень чувствительными (Jahn *et al.*, 2016; Stone and Kranz, 2013).

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего раком, предусматривающему введение пациенту композиции, содержащей указанную выше популяцию клеток, при котором рак выбран из следующего: немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), мелкоклеточный рак легких (SCLC), почечно-клеточный рак, рак головного мозга, рак желудка, рак толстой и прямой кишки, печеночно-клеточный рак (HCC), рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, лейкоз, рак молочной железы, карцинома из клеток Меркеля, меланома, рак яичников (OC), рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря и желчных протоков, рак пищевода (OSCAR), острый миелоидный лейкоз, холангиоцеллюлярная карцинома, хронический

лимфолейкоз, глиобластома, плоскоклеточный рак головы и шеи, неходжкинская лимфома и рак эндометрия.

Согласно другому аспекту клетка-хозяин может быть получена от пациента. Согласно другому аспекту клетка-хозяин может быть получена от здорового донора. Согласно другому аспекту клетка-хозяин может представлять собой CD8⁺ Т-клетку.

Согласно другому аспекту молекула МНС может представлять собой молекулу МНС класса I. Согласно другому аспекту молекула МНС может представлять собой молекулу HLA-A*02.

Предпочтительным является способ согласно настоящему изобретению, при котором указанная молекула полипептида содержит по меньшей мере один второй связывающий домен, который выбран из домена, связывающегося с молекулой клеточной поверхности, которая, как известно, индуцирует активацию иммунных клеток, или выбрана из группы, состоящей из молекул, связанных с иммунным ответом, причем предпочтительно второй связывающий домен связывается с CD3 или одной из его цепей, таких как цепи CD3 γ , CD3 δ и CD3 ϵ , CD4, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD18, CD22, CD25, CD28, CD32a, CD32b, CD33, CD41, CD41b, CD42a, CD42b, CD44, CD45RA, CD49, CD55, CD56, CD61, CD64, CD68, CD94, CD90, CD117, CD123, CD125, CD134, CD137, CD152, CD163, CD193, CD203c, CD235a, CD278, CD279, CD287, Nkp46, NKG2D, GITR, Fc ϵ RI, TCR α/β , TCR γ/δ и HLA-DR.

Согласно одному варианту осуществления молекула полипептида, содержащая указанный по меньшей мере один пептидсвязывающий домен, является растворимой молекулой. Такие растворимые молекулы полипептида, например, антитела, Т-клеточные рецепторы или их производные, как обсуждается в другом месте в настоящем документе, являются предпочтительным терапевтическим средством.

Согласно одному варианту осуществления молекула полипептида характеризуется аффинностью к пептиду («целевой пептид») комплекса пептид:МНС или к комплексу пептид:МНС, составляющей $K_D < 100$ нМ.

K_D представляет собой константу диссоциации, т.е. константу равновесия, которая измеряет склонность комплекса мишень-связывающий агент к обратимому разделению (диссоциации). Одним из способов определения K_D является поверхностный плазмонный резонанс (SPR).

Предпочтительно молекула полипептида характеризуется аффинностью к пептиду («целевой пептид») комплекса пептид:МНС или к комплексу пептид:МНС, составляющей $K_D < 100$ нМ; < 50 нМ; < 20 нМ; < 10 нМ; < 5 нМ; < 2 нМ; < 1 нМ; < 500 пМ; < 400 пМ; $<$

300 пМ; < 200 пМ; < 100 пМ; < 50 пМ; < 20 пМ; < 10 пМ; или < 1 пМ. Наиболее предпочтительно в диапазоне от 10 нМ до 500 пМ.

Согласно другому аспекту способа согласно настоящему изобретению указанный сайт прикрепления, связывающийся с указанным матричным материалом или будучи прикрепленным к нему, расположен по меньшей мере в одном связывающем домене, по меньшей мере в одном втором домене или представляет собой отдельную группу прикрепления и по существу не препятствует связыванию указанной молекулы.

Предпочтительным является способ согласно настоящему изобретению, при котором выделение молекул пептид:МНС выполняют с помощью аффинной хроматографии или иммунопреципитации после связывания указанного связывающего пептид:МНС полипептида с твердой матрицей.

Предпочтительным является способ согласно настоящему изобретению, при котором указанный матричный материал выбран из Sepharose® или агарозы. Тем не менее связывание также можно проводить в растворе без твердой матрицы (в виде партии), и комплексы можно подходящим образом выделить, например с использованием антител, осаждения, фильтрации и т.п.

Согласно другому аспекту указанный способ может дополнительно предусматривать приведение в контакт указанного образца на стадии b) и/или c) с одной или несколькими молекулами других связывающих доменов, такими как, например, широкоспецифические TCR и/или антитела.

Такая широкоспецифическая молекула связывающего домена предпочтительно представляет собой молекулу связывающего домена, которая обладает специфичностью связывания с одной или несколькими молекулами МНС отдельно, независимо от связанного с ней пептида. Такая связывающая молекула называется в настоящем документе панспецифической в отношении МНС.

Согласно одному варианту осуществления указанного способа,

(i) первую фракцию образца приводят в контакт с рМНС-связывающим полипептидом, и

(ii) вторую фракцию образца приводят в контакт с другим рМНС-связывающим полипептидом или панспецифической в отношении МНС связывающей молекулой,

и при котором дополнительно после выделения комплексов пептид:МНС, связанных с рМНС-связывающим полипептидом и другим рМНС-связывающим полипептидом или панспецифической в отношении МНС связывающей молекулой, сравнивают эффективности выделения, достигнутые в двух фракциях.

Это может быть достигнуто, например, путем объединения наборов данных масс-спектрометрии соответствующих выделений, выполненных параллельно с различными связывающими молекулами. Количественные данные для каждого идентифицированного пептида позволяют сравнить эффективность выделения пептидов между различными рМНС-связывающими полипептидами или рМНС-связывающими полипептидами и панспецифическими в отношении МНС связывающими молекулами, как показано в примере 2.

Это позволяет корректировать распространенность в природе и любое неспецифическое связывание каждого пептида в анализируемом биологическом образце путем расчета кратности изменения/коэффициента обогащения связывающих пептид:МНС полипептидов и широкоспецифических TCR или антител.

Согласно одному варианту осуществления способа на стадии b) или c) применяют большой избыток рМНС-связывающих полипептидов и необязательно панспецифических в отношении МНС связывающих молекул. Таким образом, восстановление каждого пептида не ограничивается количеством доступных сайтов связывания.

Согласно одному дополнительному варианту осуществления указанного способа аффинность связывания связывающих агентов (связывающих полипептидов или связывающих молекул), используемых в первой и второй фракциях, к различным пептидам в образце, определяют на основании сравнения эффективности выделения, как, например, проиллюстрировано в примере 3.

Авторы настоящего изобретения неожиданно показали, что соотношение степеней извлечения (= приведение в контакт и выделение) отдельных пептидов между панспецифической в отношении МНС связывающей молекулой (например, антителом ВВ7.2 и рМНС-связывающим полипептидом) коррелирует с аффинностью связывания рМНС-связывающего полипептида с этими пептидами (целевыми и нецелевыми), как видно из сравнительных экспериментов, проведенных с помощью биослойной интерферометрии (в данном случае измерения Octet; см. фиг. 12, последнее выражено в градации серого, и фиг. 13).

Таким образом, выделение предпочтительно может включать в себя приведение в контакт комплексов пептид:МНС с панспецифическим антителом к молекуле МНС. Согласно другому аспекту антитело может представлять собой по меньшей мере антитело, выбранное из W6/32, В1.23.2, ВВ7.2, GAP-A3, Spv-L3, Tü39, L243 или IVD-12. Кроме того, предпочтительным является способ, предусматривающий выделение указанной молекулы пептид:МНС параллельно с широкоспецифическим (или мультиспецифическим, или неспецифическим) связывающим пептид:МНС полипептидом, который направлен против

компонента МНС молекулы пептид:МНС, и следовательно, позволяет выделить все пептиды, связанные с определенным аллотипом МНС, независимо от природы пептидной последовательности связанного пептида (фиг. 1). Как упоминалось, такой широкоспецифический связывающий пептид:МНС полипептид может представлять собой без ограничения антитело, такое как панспецифическое в отношении HLA-A*02 антитело ВВ7.2 или панспецифическое в отношении HLA-A,B,C антитело W6/32. Дополнительные антитела, полученные из гибридомы мыши, и относящиеся к ним панспецифичности для молекул МНС человека перечислены в таблице 1.

Таблица 1: Обзор широко применяемых антител, полученных из гибридомы мышей, специфических для указанного аллотипа HLA

Клон	Специфичность	Ссылка
W6/32	HLA-A,B,C	(Barnstable <i>et al.</i> , 1978)
B1.23.2	HLA-B,C	(Rebai <i>et al.</i> , 1983)
ВВ7.2	HLA-A*02	(Parham and Brodsky, 1981)
GAP-A3	HLA-A*03	(Berger <i>et al.</i> , 1982)
Spv-L3	HLA-DQ	(Spits <i>et al.</i> , 1983)
Tü39	HLA-DR, DP, DQ	(Maeda and Hirata, 1984)
L243	HLA-DR	(Lampson and Levy, 1980)
IVD-12	HLA-DQ	(Kolstad <i>et al.</i> , 1987)

Объединение наборов данных масс-спектрометрии соответствующих выделений, выполненных параллельно, дает количественные данные для каждого идентифицированного пептида, позволяя сравнить эффективность выделения пептидов между различными связывающими пептид:МНС полипептидами или связывающими пептид:МНС полипептидами и широкоспецифическими TCR или антителами, как показано в примере 2. Это позволяет делать корректировку на распространённость в природе и любое неспецифическое связывание каждого пептида в анализируемом биологическом образце путем расчета кратности изменения/коэффициента обогащения связывающих пептид:МНС полипептидов и широкоспецифических TCR или антител.

Кроме того, предпочтительным является способ, предусматривающий выделение пептидов таким образом, чтобы он содержал дополнительную стадию выделения и истощения неспецифически связанных пептидов из смеси молекул пептид:МНС, которые связываются, например, с поверхностями материала, используемого в процедуре

выделения. Такая стадия может быть составлена другой колонкой для аффинной хроматографии, которая содержит твердую матрицу (например, Sepharose[®], агароза), но без связывающего пептид:МНС полипептида, и на которую наносят смесь молекул пептид:МНС перед стадией выделения с соответствующим связывающим пептид:МНС полипептидом (см. фиг. 1). Последующая экстракция (элюция) этих неспецифически связанных пептидов и идентификация с помощью масс-спектрометрии позволяет идентифицировать их и исключить эти пептиды из дальнейшего анализа.

Предпочтительным является способ согласно настоящему изобретению, при котором указанная идентификация на стадии d) предусматривает способ, выбранный из масс-спектрометрии и секвенирования пептидов.

Согласно одному варианту осуществления способа согласно настоящему изобретению определение характеристик связывания молекулы полипептида с пептидом комплекса пептид:МНС предусматривает идентификацию суперординатного связывающего мотива для указанного связывающего пептид:МНС домена.

Подробная информация о том, как это достигается, представлена на фиг. 7 и в соответствующем описании, а также в примере 1.

Согласно одному варианту осуществления способа согласно настоящему изобретению определение характеристик связывания молекулы полипептида с пептидом комплекса пептид:МНС предусматривает следующее:

а) идентификация основанного на положении и/или суперординатного связывающего мотива молекулы полипептида для указанного связывающего пептид:МНС домена и/или

б) идентификация нецелевых пептидов молекулы полипептида для связывающих пептид:МНС доменов с использованием пептидов, идентифицированных в представленной заявке.

Подробная информация о том, как это достигается, представлена на фиг. 7 и в соответствующем описании, а также в примере 1.

Согласно одному варианту осуществления способа согласно настоящему изобретению определение характеристик связывания молекулы полипептида с пептидом комплекса пептид:МНС предусматривает исследование и/или идентификацию перекрестной реактивности указанного пептида по отношению к другим связывающим пептид:МНС доменам.

Используемый в настоящем документе термин «суперординатный связывающий мотив» используется для описания того, какие аминокислоты допустимы в каком

положении пептидной последовательности при сохранении связывания связывающего пептид:МНС полипептида.

Используемый в настоящем документе термин «основанный на положении связывающий мотив» используется для описания того, какие положения в аминокислотной последовательности связанного пептида имеют отношение к взаимодействию со связывающим пептид:МНС полипептидом.

Используемый в настоящем документе термин «нецелевые пептидные последовательности» относится к пептидным последовательностям, которые способны связываться с данным связывающим пептид:МНС полипептидом, хотя их последовательности отклоняются от последовательности пептида, для которого связывающий пептид:МНС полипептид был изначально разработан или выбран. Следовательно, существует риск того, что, если такие нецелевые пептидные последовательности, например, представлены на здоровой незлокачественной ткани, то связывающий пептид:МНС полипептид будет проявлять цитотоксическую активность против здоровой ткани («внеопухолевая/неспецифическая в отношении мишени» токсичность).

Подробная информация о том, как это достигается, представлена на фиг. 7 и 12-15, а также в соответствующем описании и в представленных примерах. Кроме того, предпочтительным является способ согласно настоящему изобретению, при котором идентифицированные пептидные последовательности используют для вывода информации о характеристиках связывания связывающего пептид:МНС полипептида. Такую информацию можно, например, использовать для создания связывающих мотивов связывающего пептид:МНС полипептида. Эти связывающие мотивы обычно используют для описания того, какие положения в аминокислотной последовательности связанного пептида имеют отношение к взаимодействию со связывающим пептид:МНС полипептидом («основанный на положения связывающий мотив») и, кроме того, какие аминокислоты допустимы в каких положение пептидной последовательности при сохранении связывания связывающего пептид:МНС полипептида («суперординатный связывающий мотив»). Анализ аминокислотных последовательностей идентифицированных пептидов и присутствие в выбранных положениях пептидной последовательности облегчает создание этих связывающих мотивов. Последний можно дополнительно использовать для выполнения прогнозов релевантных для безопасности нецелевых пептидов, например, из баз данных последовательностей белков с использованием информации, содержащейся в связывающем мотиве, в качестве критериев поиска.

Предпочтительным является способ согласно настоящему изобретению, при котором идентификация последовательности достигается с помощью масс-спектрометрии таким образом, что все пептидные последовательности, содержащиеся после стадии выделения, идентифицируются всесторонне, количественно, с наивысшей чувствительностью и с высокой степенью достоверности совпадения идентифицированных последовательностей.

В контексте настоящего изобретения может предпочтительно применяться один из перечисленных ниже методов и способов:

а) Специальное использование или комбинация любого количества различных масс-спектрометрических машин и методов масс-спектрометрической фрагментации (например, индуцированная столкновениями диссоциация (CID), индуцированная столкновениями с поверхностью диссоциация (SID), диссоциация с захватом электронов (ECD), высокоэнергетическая диссоциация С-ловушки (HCD), диссоциация с переносом электрона (ETD), диссоциация с переносом отрицательного электрона (NETD), диссоциация с отрывом электрона (EDD), инфракрасная многофотонная диссоциация (IRMPD), инфракрасная радиационная диссоциация черного тела (BIRD), диссоциация с переносом электрона/столкновением с более высокой энергией (ETHCD), ультрафиолетовая фотодиссоциация (UVPD), индуцированная переносом электрона и столкновениями диссоциация (ETCID)) или энергии активации, чтобы обеспечить лучшее покрытие последовательностей спектров тандемной MS (MS/MS) пептида.

б) Масс-спектрометрические эксперименты в информационно-зависимом (DDA), а также информационно-независимом режиме сбора данных (DIA). Это может дополнительно включать в себя специфические стратегии сбора данных, использующие заранее определенный перечень пептидных последовательностей (нацеленный анализ) или другие способы, такие как последовательное получение окна для анализа всех теоретических масс-спектров (SWATH).

в) Предварительное разделение смесей пептидов, например, с помощью ВЭЖХ (например, нано-УВЭЖХ с градиентом ацетонитрила в воде) до или непосредственно в сочетании с масс-спектрометрическим анализом.

г) Повторение измерений той же смеси пептидов, чтобы обеспечить более надежную статистическую оценку.

е) Поиск спектров MS/MS с использованием различных поисковых систем (например, MASCOT, Sequest, Andromeda, Comet, XTandem, MS-GF+) или программных инструментов с использованием одной из этих поисковых систем, а также алгоритмов идентификации *de novo* последовательностей.

f) Поиск с дополнительным использованием вычислительных инструментов для прогнозирования спектров MS/MS, например pDeer (Zhou *et al.*, 2017).

g) Поиск спектров MS/MS в различных базах данных последовательностей белков (например, UniProtKB, IPI), а также в специальных базах данных последовательностей, созданных для конкретных целей (например, последовательностей белков, транскрибуемых из последовательностей мРНК).

h) Масс-спектрометрические измерения синтетических версий рассматриваемых пептидов для подтверждения их идентичности путем сравнения специфических характеристик пептидов, таких как их спектры MS/MS и их время удерживания, например, на колонке для ВЭЖХ.

i) Поиск спектров MS/MS с использованием базы данных ранее идентифицированных спектров MS/MS (например, библиотека спектров или архив спектров). Эту базу данных можно использовать для процесса идентификации пептидов путем сравнения вновь записанных спектров MS/MS с соответствующими спектрами MS/MS уже идентифицированных пептидных последовательностей.

j) Любая база данных, описанная в i), в которой дополнительно храниться информация об экспериментальном или прогнозируемом времени удерживания (RT) уже идентифицированных пептидов, чтобы помочь процессу идентификации.

k) Количественная оценка площадей сигнала пептида на уровне MS или MS/MS, например, путем извлечения и интеграции характеристик MS с использованием соответствующих алгоритмов (например, SuperHirn) (Mueller *et al.*, 2007).

Предпочтительным является способ согласно настоящему изобретению, дополнительно предусматривающий стадию идентификации презентирования указанного пептида или пептидов на раковых и/или незлокачественных клетках или тканях.

Такая идентификация включает как идентификацию связывающего мотива, так и нецелевых пептидных последовательностей, идентифицированных, как описано в другом месте в настоящем документе, в раковой или незлокачественной ткани.

С этой целью можно проанализировать комплексы пептид:МНС, представленные на клетках из образцов раковых и незлокачественных тканей.

Один из способов сделать это - выделить все комплексы пептид:МНС («иммунопептидом»), например, с помощью иммуноаффинного захвата. Представленные пептиды затем могут быть диссоциированы от МНС, например, посредством кислотной денатурации. Затем пептид-носитель экстрагируют и отделяют на фракции с помощью ВЭЖХ, и пептидные последовательности в этих фракциях идентифицируют с помощью ЖХ-МС/МС. Таким образом, несколько тысяч пептидов можно идентифицировать из

широкого разнообразия типов клеток, включая в себя раковые и инфицированные клетки и клетки из тканей.

Полученные таким образом пептидные последовательности затем вводят в базу данных с аннотацией, были ли обнаружены соответствующие пептиды на раковых и/или незлокачественных клетках или тканях. Затем такую базу данных можно сканировать на предмет презентирования пептидов, соответствующих связывающим мотивам или суперординатным мотивам, идентифицированным, как описано в другом месте в настоящем документе.

Способы и протоколы для достижения этого раскрыты, среди прочего, в WO2005076009, WO2011128448 и WO2016107740, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки, и все они переданы настоящему заявителю.

Таким образом, способы согласно настоящему изобретению могут дополнительно предусматривать оценку идентифицированных пептидов на предмет их значимости для возникновения неспецифической в отношении мишени токсичности путем дальнейшего исследования с применением любого из следующих методов, но не ограничиваясь ими:

- i) Анализ профилей экспрессии гена исходного гена указанных нецелевых пептидов на различных нормальных или раковых тканях, а также на клеточных линиях;
- ii) Анализ профилей презентирования пептидов указанных нецелевых пептидов на различных нормальных или раковых тканях, а также на клеточных линиях; и
- iii) Анализ числа копий пептида на клетку указанных нецелевых пептидов на различных нормальных или раковых тканях, а также на клеточных линиях.

Согласно другому важному аспекту способа согласно настоящему изобретению указанный способ дополнительно предусматривает стадию компьютерного анализа указанной идентификации и/или нецелевого связывания, в частности, при подготовке к дальнейшей(им) модификации(ям) связывающих пептид:МНС полипептидов, раскрытых в настоящем документе. Соответствующие программы хорошо известны специалистам.

Согласно настоящему изобретению, если с помощью указанного способа идентифицируются нецелевые пептиды, затем можно соответствующим образом изменить связывающие пептид:МНС полипептиды, чтобы уменьшить связывание с этими нецелевыми пептидами. Такие изменения включают в себя модификацию аминокислотной последовательности связывающих пептид:МНС полипептидов, в частности, на этапах созревания, чтобы улучшить специфичность связывающего пептид:МНС полипептида. Таким образом, специфичность вновь созданных молекул может быть значительно улучшена, как показано на примере уменьшенного уничтожения целевой отрицательной клеточной линии T98G на фигуре 2. Способы соответствующего созревания связывающих

пептид:МНС полипептидов известны специалистам, и в частности, включают в себя изменения в связывающем пептид:МНС полипептиде, например, шесть определяющих комплементарность областей (CDR) TCR. Аналогичным образом можно соответствующим образом модифицировать CDR антитела (см., например, (Smith *et al.*, 2014; Stewart-Jones *et al.*, 2009); US 2014-0065111A1; WO 2017/174823A1; WO 2016/199141; и WO 2012/013913).

В таком случае предпочтительным является способ согласно настоящему изобретению, при котором указанный биологический образец, из которого получена смесь пептид:МНС, выбран из одной или нескольких линий раковых клеток, которые можно проанализировать отдельно или объединить на стадии выделения указанного способа. На фиг. 3 на основе данных XPRESIDENT[®] показано, как комбинация нескольких клеточных линий увеличит покрытие пептидного пространства нормальной ткани, что можно решить напрямую с помощью этого способа, выбрав несколько клеточных линий для создания образца. Квалифицированный специалист может также захотеть объединить несколько клеточных линий с сильной экспрессией МНС или модифицировать такие клеточные линии, например, путем трансфекции или вирусной трансдукции с помощью представляющего интерес гена или обработки веществом или химическим соединением (например, интерфероном гамма) для увеличения или модификации экспрессии МНС таким образом, чтобы увеличить или модифицировать количество различных пептидов, презентируемых молекулами МНС в таких клеточных линиях. Эти гены могут представлять собой без ограничения специфические гены МНС класса I или класса II (например, HLA-A*02, HLA-DRB3), гены, участвующие в процессинге и презентировании пептида МНС (например, TAP1/2, LMP7) или факторы транскрипции, способные индуцировать или модифицировать экспрессию генов клеток (например, AIRE).

Кроме того, предпочтительным является способ согласно настоящему изобретению, при котором указанный биологический образец, из которого получена смесь пептид:МНС, выбран из одного или нескольких первичных образцов нормальной ткани или крови здоровых доноров, а также опухолевых тканей пациентов с раком или инфицированной ткани. Особое значение имеют нормальные ткани или выделенные клетки, происходящие из этих тканей или определенных частей тела, с высоким риском фатальных нежелательных явлений в случае перекрестного распознавания пептида на этих тканях. Такие нормальные ткани или выделенные из них клетки могут представлять собой без ограничения следующее: ткань головного мозга, ткань сердца, кровь, ткань легкого, спинной мозг, нервная ткань или ткань печени.

Все биологические образцы могут являться свежими или обработанными (например, замороженными или приготовленными), при условии, что они все еще применимы для

способа согласно настоящему изобретению. Согласно одному аспекту биологические образцы могут включать в себя ткани, органы, клетки, белки или мембранные экстракты клеток, кровь или биологические жидкости, такие как кровь, сыворотка, слезь, моча, асцитная жидкость или мозговая жидкость, полученные от субъекта.

Согласно одному варианту осуществления способа согласно настоящему изобретению указанный способ дополнительно предусматривает добавление к указанному образцу на стадии а) по меньшей мере следующего:

один пептид с известной последовательностью и/или один определенный и/или предварительно выбранный комплекс пептид:МНС, пептид которого характеризуется известной последовательностью, предпочтительно в заранее определенном количестве («добавление точного количества»).

Согласно одному варианту осуществления последовательность указанного пептида изменена или мутирована относительно последовательности пептида («целевой пептид») комплекса пептид:МНС, с которой связывается молекула полипептида, которая содержит по меньшей мере один определенный пептидсвязывающий домен («рМНС-связывающий полипептид»).

Согласно одному варианту осуществления создают серию мутантов пептида («целевого пептида») комплекса пептид:МНС, с которым связывается молекула полипептида, содержащая по меньшей мере один определенный пептидсвязывающий домен («рМНС-связывающий полипептид»), и добавляют к образцу на стадии а). При этом каждый мутант содержит по всей своей длине или по меньшей мере по ее субфракции аминокислотный остаток в одном положении, замещенный на альтернативную аминокислоту.

Согласно одному варианту осуществления каждый мутант содержит по всей своей длине или по меньшей мере по ее субфракции, аминокислотный остаток в одном положении, замещенный на аланин или глицин, как, например, проиллюстрировано в примере 5.

Как было сказано, полученные таким образом мутантные пептиды можно добавить в точном количестве в образец (например, библиотеку рHLA или клеточный лизат) на стадии а) представленного способа. Такой подход позволяет еще лучше охарактеризовать суперординатный связывающий мотив и идентифицировать потенциальные нецелевые пептиды.

Согласно одному варианту осуществления синтетические пептиды, используемые для добавления точного количества, происходят из встречающихся в природе пептидов,

например на основе масс-спектрометрических или геномных данных и выбраны на основе определенных критериев, таких как химическое сходство с целевым пептидом, как показано в примере 4.

Согласно одному варианту осуществления с использованием способов, обсуждаемых в настоящем документе, нет необходимости включать последовательность целевого пептида в образец для оценки этих пептидов. Кроме того, согласно указанному варианту осуществления не требуется вычислять какие-либо отношения относительно целевой пептидной последовательности или других пептидных последовательностей. Сила связывания мутированных пептидов определяется только по степени их извлечения в связывающем агенте по сравнению с препаратами ВВ7.2.

Согласно одному варианту осуществления якорные положения пептида («целевой пептид») комплекса пептид:МНС, с которым связывается молекула полипептида, содержащая по меньшей мере один определенный пептидсвязывающий домен («рМНС-связывающий полипептид»), не изменены/мутированы.

В этом контексте следует отметить, что так называемые «якорные остатки» (сокращенно «AR» в настоящем документе) опосредуют связывание пептида со связывающей бороздкой пептида в МНС. В HLA-A*02:01 этими якорными остатками чаще всего являются лейцин в P2 и лейцин или валин в P9, и они играют лишь незначительную роль в реакции связывания между связывающим полипептидом и комплексом пептид:МНС.

Согласно другому предпочтительному аспекту способа согласно настоящему изобретению смеси молекулы пептид:МНС можно создать искусственно путем биотехнологического производства. Последнее может быть достигнуто, но не ограничивается трансформацией и экспрессией молекулы МНС в прокариотической (например, *E. coli*) системе. Такие молекулы МНС могут быть дополнительно модифицированы для увеличения их растворимости, например, путем замены или изменения трансмембранной части таких молекул. Загрузка пептидом и восстановление таких молекул могут быть достигнуты без ограничения повторной укладкой телец включения компонентов МНС (например, тяжелой цепи(ей) белка и бета-2 микроглобулина) в присутствии представляющего интерес пептида, а также дополнительных химических веществ (глутатион, аргинин и т.д.), которые способствуют восстановлению требуемой молекулы

Квалифицированный специалист может захотеть объединить несколько из этих искусственно полученных молекул пептид:МНС, нагруженных различными пептидами, для создания библиотеки из десятков, сотен, тысяч, до десяти тысяч или сотен тысяч

различных молекул пептид:МНС, которые можно протестировать со связывающим пептид:МНС полипептидом согласно представленному способу. Квалифицированный специалист может дополнительно захотеть добавить точное количество этих смесей искусственно созданных молекул пептид:МНС в другую смесь молекул пептид:МНС из биологического источника. Согласно другому аспекту квалифицированный специалист может восстановить эти искусственно созданные молекулы пептид:МНС пептидом, содержащим одну или несколько тяжелых стабильных изотопных меток, таких как без ограничения ^{13}C , ^{15}N или ^2H . Эти молекулы пептид:МНС затем можно добавить в точном количестве в другую смесь молекул пептид:МНС, например, из биологического образца, чтобы получить дополнительную информацию о представляющем интерес пептиде, содержащем тяжелую метку, и получить количественные данные масс-спектрометрии об эффективности выделения пептида с использованием представленного способа.

Согласно другому предпочтительному аспекту способа согласно настоящему изобретению способ комбинируют с вычислительным анализом указанной идентификации и/или нецелевого связывания.

Эта дополнительная информация может быть установлена, но может не ограничиваться расчетом показателей сходства пептидов и связывания пептидов с молекулами МНС, таких как РМВЕС, Blosum62, Pam250, NetМНС, NetМНСpan, SYFPEITHI.

Термин «сходство» двух пептидов принимает во внимание родство двух аминокислот в данном положении (см., например, ниже таблицу 1a). Сходные аминокислотные последовательности, например нецелевую пептидную последовательность, сходную с целевой пептидной последовательности, можно получить из баз данных белков с использованием алгоритма BLAST, который выполняет статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, (Karlin and Altschul, 1993)). Предпочтительными настройками для такого выравнивания являются: длина слова 3 и ожидание (E), составляющее 10, а также использование матрицы замен BLOSUM62 или РМВЕС (Kim *et al.*, 2009), предпочтительно матрицу замен РМВЕС используют при определении сходства. Эти матрицы количественно определяют сходство аминокислот, основанное, например, на эволюционном или функциональном сходстве между аминокислотами, которое хорошо коррелирует со сходством согласно физико-химическим параметрам. Для каждой замены аминокислоты в данной последовательности целевого пептида может быть рассчитан показатель в баллах (десятичное значение) с использованием этих матриц, которая указывает на сходство аминокислоты в последовательности целевого пептида с замещенной аминокислотой в последовательности

нецелевого пептида. Множественные замены можно рассматривать, суммируя эффект (баллы) отдельных замен в последовательности целевого пептида. По определению, максимальный показатель в баллах, которая может быть достигнут для нецелевого пептида, обеспечивается последовательностью незамещенного целевого пептида, тогда как любая замена, приводящая к нецелевому пептиду, будет штрафоваться в матрице замен и в конечном итоге приведет к более низкому показателю в баллах для нецелевого пептида. Однако этот максимальный балл зависит от длины и аминокислотной последовательности целевого пептида (т.е. разные последовательности целевого пептида будут иметь разные максимальные баллы). Как правило, более длинные аминокислотные последовательности дают более высокий балл. Однако показатель в баллах целевого пептида зависит от показателя в баллах, присвоенного аминокислотам, из которых он состоит. Чтобы иметь возможность вычислять и сравнивать сходство нецелевого пептида по отношению к целевому пептиду без учета разницы максимальных баллов отдельных последовательностей целевого пептида, соответствующие десятичные значения преобразуются, что является результатом вычисления сходства нецелевого пептида по отношению к целевому пептиду, в баллы в процентах, где максимальный балл последовательности целевого пептида, следовательно, всегда будет составлять 100%

Таблица 1а: Аминокислоты и консервативные и полуконсервативные замены соответственно. Замена А, F, H, I, L, M, P, V, W или Y на С является полуконсервативной, если новый цистеин остается в виде свободного тиола. Кроме того, специалисту будет понятно, что глицина в стерически сложных положениях не следует заменять.

Аминокислота	Консервативная замена	Полуконсервативная замена
A	G; S; TN; V; C	
C	A; V; L	M; I; F; G
D	E; N; Q	A; S; T; K; R; H
E	D; Q; N	A; S; T; K; R;
F	W; Y; L; M; H	I; V; A
G	A	S; N; T; D; E; N; Q
H	Y; F; K; R	L; M; A
I	V; L; M; A	F; Y; W; G
K	R; H	D; E; N; Q; S; T; A
L	M; I; V; A	F; Y; W; H; C

M	L; I; V; A	F; Y; W; C;
N	Q	D; E; S; T; A; G; K; R
P	V; I	L; A; M; W; Y; S; T; C; F
Q	N	D; E; A; S; T; L; M; K; R
R	K; H	N; Q; S; T; D; E; A
S	A; T; G; N	D; E; R; K
T	A; S; G; N; V D; E; R; K; I	
V	A; L; I M; T; C; N	
W	F; Y; H	L; M; I; V; C
Y	F; W; H	L; M; I; V; C

Настоящее изобретение теперь будет описано со ссылкой на следующие примеры, но не ограничиваясь ими. Для целей настоящего изобретения все ссылки, процитированные в настоящем документе, полностью включены посредством ссылки.

Пояснения фигур

Фиг. 1: Схематический обзор экспериментального подхода согласно настоящему изобретению. Образец, содержащий молекулы пептид:МНС, получают, например, путем создания лизата клеток, экспрессирующих пептид:МНС, происходящего из ткани или линии клеток. В качестве альтернативы, образец можно модифицировать путем добавления или составления смесей искусственно полученных молекул пептид:МНС. Конкретные молекулы пептид:МНС выделяют из этого образца, например, путем приведения его в контакт с матрицей, к которой прикреплен связывающий пептид:МНС полипептид. Колонки с глицином, которые не содержат прикрепленный полипептид, можно использовать для истощения в образце неспецифически выделенных молекул пептид:МНС, которые неспецифически взаимодействуют с матрицей. Масс-спектрометрию можно использовать для идентификации пептидов, связанных с МНС, которые были выделены из образца для идентификации и секвенирования пептидного пространства, распознаваемого связывающим пептид:МНС полипептидом. Таким образом, ранее неизвестные нецелевые риски могут быть выявлены без использования инструментов прогнозирования. В модификации этого подхода один и тот же образец, содержащий молекулу пептид:МНС, можно разделить и параллельно подвергнуть второй аффинной хроматографии с широкоспецифическими HLA антителами или TCR, которые связываются с этими молекулами, независимо от типа связанного пептида. В проиллюстрированном примере панспецифическое в отношении HLA-A*02 антитело BB7.2 используют для выделения всех

пептидов, презентированных HLA-A*02, независимо от пептидной последовательности, что в настоящем документе называется иммунопептидом HLA-A*02. Распространенность представляющих интерес (например, нецелевых) пептидов в обоих выделениях можно использовать для оценки аффинности связывания связывающего пептид:МНС полипептида для указанного пептида по сравнению с используемым широкоспецифическим антителом или TCR, в этом примере BB7.2.

Фигура 2: Эксперименты по цитотоксичности, показывающие уничтожение целевой положительной (U2OS) и целевой отрицательной (T98G) клеточной линии двумя вариантами PRAME-004-специфического связывающего пептид:МНС полипептида (черные прямоугольники: исходный вариант, белые точки: вариант с улучшенной специфичностью после дополнительного цикла созревания специфического связывающего пептид:МНС агента, направленного против PRAME-004, с использованием идентифицированных нецелевых пептидов в качестве детерминант отбора). Уничтожение целевой отрицательной клеточной линии T98G сильно снижается при использовании варианта связывающего пептид:МНС полипептида с улучшенной специфичностью, тогда как уничтожение целевой положительной клеточной линии U2OS подвергается лишь незначительному влиянию.

Фигура 3: Комбинацию нескольких клеточных линий для получения образцов можно использовать для достижения высокого покрытия иммунопептидом, презентированного HLA-A*02. На основании данных об иммунопептидоме XPRESIDENT[®] для 60 клеточных линий показано, что комбинация уже 10 из этих клеточных линий позволит охватить более 60% иммунопептидома HLA-A*02, если необходимо учитывать пептиды, для которых ранее было обнаружено по меньшей мере 10 идентификаций пептидов в нормальных тканях.

Фигура 4: Анализ цитотоксичности всех пептидов, идентифицированных в анализе с использованием специфического для PRAME-004 связывающего пептид:МНС полипептида из примера 1. Вкратце T2-клетки, нагруженные 10 нМ соответствующих пептидов, инкубировали совместно с CD8⁺ Т-клетками человека в присутствии указанных концентраций специфического для PRAME-004 связывающего пептид:МНС полипептида. Через 48 часов цитотоксичность определяли количественно путем измерения высвобождения LDH.

Фигура 5: Анализ профиля экспрессии пептида, кодирующего исходный экзон IFT17-003, в различных нормальных, а также опухолевых тканях. Образцы опухоли (черные точки) и нормальные образцы (серые точки) сгруппированы в соответствии с органом происхождения. Диаграммы размаха представляют собой медианное значение

ФРКМ, 25-й и 75-й процентиля (прямоугольник) плюс усы, которые простираются до самой низкой точки данных, все еще в пределах 1,5 межквартильного размаха (IQR) от нижнего квартиля, и самой высокой точки данных, все еще в пределах 1,5 IQR от верхнего квартиля. Нормальные органы расположены в алфавитном порядке. ФРКМ: количество фрагментов на тысячу пар оснований на миллион отображенных прочтений. Ткани (слева направо): нормальные образцы: жировая ткань; надпочечник; желчный проток; мочевой пузырь; клетки крови; кровеносные сосуды; костный мозг; головной мозг; молочная железа; пищевод; глаз; желчный пузырь; голова и шея; сердце; толстая кишка; тонкая кишка; почка; печень; легкое; лимфатический узел; периферический нерв; яичник; поджелудочная железа; паращитовидная железа; брюшина; гипофиз; плацента; плевра; предстательная железа; скелетная мышца; кожа; спинной мозг; селезенка; желудок; яичко; вилочковая железа; щитовидная железа; трахея; мочеточник; матка. Образцы опухолей: AML (острый миелоидный лейкоз); BRCA (рак молочной железы); CCC (холангиоцеллюлярная карцинома); CLL (хронический лимфолейкоз); CRC (рак толстой и прямой кишки); GBC (рак желчного пузыря); GBM (глиобластома); GC (рак желудка); HCC (печеночно-клеточная карцинома); HNSCC (плоскоклеточный рак головы и шеи); MEL (меланома); NHL (неходжкинская лимфома); NSCLCадено (аденокарцинома - немелкоклеточный рак легкого); NSCLCдругие (образцы NSCLC, которые нельзя однозначно отнести к NSCLCадено или NSCLCплоск.); NSCLCплоск. (плоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого); OC (рак яичников); OSCAR (рак пищевода); PACA (рак поджелудочной железы); PRCA (рак предстательной железы); RCC (почечно-клеточная карцинома); SCLC (мелкоклеточный рак легкого); UBC (карцинома мочевого пузыря); UEC (рак эндометрия матки).

Фигура 6: Анализ пептидной презентации IFT17-003 на различных нормальных, а также опухолевых тканях. Верхняя часть: медианная интенсивность сигналов MS из технических повторных измерений нанесена в виде точек для отдельных HLA-A*02 положительных нормальных образцов (серые точки, левая часть фигуры) и образцов опухоли (черные точки, правая часть фигуры), на которых был обнаружен пептид. Прямоугольники отображают медиану, 25-й и 75-й процентиля нормализованной интенсивности сигнала, в то время как усы простираются до самой низкой точки данных, все еще в пределах 1,5 интерквартильного размаха (IQR) нижнего квартиля, и самая высокая точка данных все еще находится в пределах 1,5 IQR верхнего квартиля. Нормальные органы расположены в алфавитном порядке. Нижняя часть: относительная частота обнаружения пептидов в каждом органе показана на спинограмме. Цифры под панелью указывают количество образцов, в которых был обнаружен пептид, из общего

количества образцов, проанализированных для каждого органа (N = 592 для нормальных образцов, N = 710 для образцов опухоли). Если пептид был обнаружен в образце, но не может быть определен количественно по техническим причинам, образец включается в это представление частоты обнаружения, но точка в верхней части фигуры не отображается. Ткани (слева направо): нормальные образцы: жировая ткань; надпочечник; желчный проток; мочевой пузырь; клетки крови; кровеносные сосуды; костный мозг; головной мозг; молочная железа; пищевод; глаз; желчный пузырь; голова и шея; сердце; толстая кишка; тонкая кишка; почка; печень; легкое; лимфатический узел; центральный нерв; периферический нерв; яичник; поджелудочная железа; паращитовидная железа; брюшина; гипофиз; плацента; плевра; предстательная железа; скелетная мышца; кожа; спинной мозг; селезенка; желудок; яичко; вилочковая железа; щитовидная железа; трахея; мочеточник; матка. Образцы опухолей: AML (острый миелоидный лейкоз); BRCA (рак молочной железы); CCC (холангиоцеллюлярная карцинома); CLL (хронический лимфолейкоз); CRC (рак толстой и прямой кишки); GBC (рак желчного пузыря); GBM (глиобластома); GC (рак желудка); GEJC (рак желудочно-пищеводного соединения); HCC (печеночно-клеточная карцинома); HNSCC (плоскоклеточный рак головы и шеи); MEL (меланома); NHL (неходжкинская лимфома); NSCLCадено (аденокарцинома - немелкоклеточный рак легкого); NSCLCдругие (образцы NSCLC, которые нельзя однозначно отнести к NSCLCадено или NSCLCплоск.); NSCLCплоск. (плоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого); OC (рак яичников); OSCAR (рак пищевода); PACA (рак поджелудочной железы); PRCA (рак предстательной железы); RCC (почечно-клеточная карцинома); SCLC (мелкоклеточный рак легкого); UBC (карцинома мочевого пузыря); UEC (рак эндометрия матки).

Фигура 7: Суперординатный связывающий мотив направленного на PRAME-004 связывающего пептид:МНС полипептида, определенный с использованием описанного способа и отображаемый в формате лигатуры последовательностей. Размер отдельных аминокислот в выбранных положениях отражает их распространенность среди идентифицированных нецелевых пептидов. Таким образом, этот подход обеспечивает точную информацию о связывающем мотиве направленного на PRAME-004 связывающего пептид:МНС полипептида.

Например, в идентифицированных нецелевых пептидах гистидин (H) в положении 5 пептидной последовательности встречался чаще по сравнению с лизином (K), что означает, что в указанном положении гистидин является предпочтительным для связывающего полипептида PRAME-004. Другими словами: пептид, содержащий остаток гистидина в положении 5, будет связываться с соответствующим связывающим

полипептидом PRAME-004 с более высокой аффинностью, чем пептид, содержащий остаток лизина в положении 5. Любая другая аминокислота, кроме гистидина или лизина в положении 5, еще больше снизит аффинность соответствующего пептида.

Как можно видеть, связывающий мотив, принимаемый соответствующим связывающим полипептидом PRAME-004, довольно гибкий в положениях 1, 3 и 4, тогда как в положениях 5-8 можно определить явное предпочтение выбранных аминокислотных остатков со следующей иерархией, как показано в таблице 1b:

Таблица 1b: Иерархия предпочтений аминокислот в положениях 5, 6, 7 и 8 PRAME-004 для соответствующего связывающего полипептида PRAME-004

Положение	Иерархия предпочтения/допустимости
5	H>K
6	L>N>V>A>I>Q>T
7	I>L>M>K>P>V
8	T>G>S>K>A>D>L>P

В этом контексте следует отметить, что так называемые «якорные остатки» (сокращенно «AR» в настоящем документе) опосредуют связывание пептида со связывающей бороздкой пептида в МНС. В HLA-A*02:01 этими якорными остатками чаще всего являются лейцин в P2 и лейцин или валин в P9, и они играют лишь незначительную роль в связывающем взаимодействии между связывающим полипептидом и комплексом пептид:МНС.

Далее показана полноразмерная последовательность PRAME (антиген меланомы, предпочтительно экспрессируемый в опухолях, UniProt: P78395), причем последовательность целевого пептида PRAME-004 (SLLQHLIGL, SEQ ID NO: 1) показана жирным подчеркиванием:

>sp|P78395|PRAME_HUMAN Антиген меланомы, преимущественно экспрессируемый в опухолях OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRAME PE=1 SV=1

MERRRLWGSIQSRYISMSVWTSPPRLVELAGQSLLKDEALAIAALELLPRELFPPLFMAA
FDGRHSQTLKAMVQAWPFTCLPLGVLMKGQHLHLETFKAVLDGLDVLLAQEVRRRWKLO
VLDLRKNSHQDFWTVWVSGNRASLYSFPEPEAAQPMTKKRKVDGLSTEAEQPFIPVEVLVD
LFLKEGACDELF SYLIEKVKRKKNVLRLLCCKLKI FAMPQDIKMLKMQVLDSDIEDLEV
TCTWKLPTLAKFSPYLGQMINLRLLLSHIHASSYISPEKEEQYIAQFTSQFLSLQCLQA
LYVDSLFFLRGRDQLLRHVMNPLETLSITNCRLESGDVMHLSQSPSVSLSVLSLSGVM
LTDVSPPEPLQALLERASATLQDLVDFDECGITDDQLLALLPSLSHCSQLTTLSFYGNSISI
SALQ**SLLQHLIGL**SNLTHVLYPVPLESYEDINGTLHLERLAYLHARLRELLCELGRPSMV
WLSANPCPHCGDRTFYDPEPILCPCFMPN

Следовательно, на основе приведенных выше данных можно определить основанный на положении связывающий мотив и суперординатный связывающий мотив, как показано в следующих таблицах 1c и 1d:

Таблица 1c: Основанный на положении связывающий мотив и суперординатный связывающий мотив соответствующего связывающего полипептида PRAME-004.

Положение	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Последовательность PRAME-004	S	L	L	Q	H	L	I	G	L
Основанный на положении связывающий мотив	X	AR	X	X	H	L	I	G	AR
Суперординатный связывающий мотив	нет предпочтения	AR	нет предпочтения	нет предпочтения	H>K	L>N> V>A> I>Q> T	I>L> M>K >P>V	T>G> S>K> A>D> L>P	AR

Обладая этой информацией, можно затем идентифицировать нецелевые пептиды молекулы полипептида для связывающих пептид:МНС полипептидов, просто перетасовывая предпочтительные остатки, в то время как заполнители в остатках не имеют никаких предпочтений. В итоге получится перечень потенциальных последовательностей нецелевых пептидов.

В качестве следующей стадии затем можно выполнить поиск в соответствующих базах данных, где заархивированы пептиды, представленные в комплексах пептид:МНС, как описано в другом месте в настоящем документе, в отношении пептидов, содержащих такие связывающие мотивы.

Таблица 1d: Пептиды, идентифицированные представленным способом, содержащие общий суперординатный связывающий мотив, как определено выше

Код пептида	SEQ ID NO	AR				Суперординатный связывающий мотив				AR
PRAME-004	1	S	L	L	Q	H	L	I	G	L
IFT17-003	2	F	M	N	P	H	L	I	S	V
MCM5-006	3	M	L	A	K	H	V	I	T	L

IFIT1-001	4	V	L	L	H	H	Q	I	G	L
FADS2-001	5	L	L	L	A	H	I	I	A	L
CTBP1-001	6	A	L	M	Y	H	T	I	T	L
ITSN1-001	7	I	L	A	M	H	L	I	D	V
ATP1A1-001	8	F	L	P	I	H	L	L	G	L
MCMB-002	9	Y	L	I	L	H	L	I	S	T
EHD4-001	10	A	L	A	K	H	L	I	K	I
SF3B3-005	11	T	L	V	Y	H	V	V	G	V
EHD-001	12	A	L	A	N	H	L	I	K	V
FARSA-001	13	L	T	L	G	H	L	M	G	V
INTS7-002	14	I	L	G	T	H	N	I	T	V
MLXI-001	15	K	L	T	S	H	A	I	T	L
PPP4R1-003	16	H	L	M	P	H	L	L	T	L
RIF1-004	17	A	I	W	E	K	L	I	S	L
SFXN3-001	18	S	L	T	K	H	L	P	P	L
TBCK-002	19	A	L	S	P	H	N	I	L	L
TNRC6B-001	20	S	L	A	R	H	L	M	T	L
ZFYVE16-002	21	A	L	C	P	H	L	K	T	L

Затем эти пептиды можно синтезировать и протестировать на перекрестную реактивность с соответствующим связывающим полипептидом PRAME-004.

Фигура 8: Идентификация основанного на положении связывающего мотива связывающего пептид:МНС полипептида, направленного против PRAME-004, с использованием позиционного сканирования с заменой каждой аминокислоты в положениях 1-9 пептидной последовательности, за исключением якорных остатков, на аланин. Отношение KD целевого пептида PRAME-004 к замещенному аланином варианту пептидной последовательности представлено для каждого пептида. Пороговое значение отношения KD в 50% (пунктирная линия) применяется для определения положений, которые распознаются связывающим агентом. Значения KD определяли с помощью биослойной интерферометрии.

По сравнению со способом согласно настоящему изобретению, который предоставляет подробную информацию о суперординатном связывающем мотиве, а также о нецелевых пептидных последовательностях и, следовательно, позволяет исследовать и/или идентифицировать перекрестную реактивность для указанного связывающего пептид:МНС полипептида, простая замена каждой аминокислоты на аланин дает только

очень ограниченную информацию, а именно простую идентификацию положений, в которых данный аминокислотный остаток необходим для распознавания связывающим агентом.

Фигура 9: Определение связывающего мотива комплекса с использованием аминокислотных замен со всеми протеиногенными аминокислотами в каждом положении (кроме цистеина). Отношения KD целевого пептида PRAME-004 к соответствующему варианту позиционного сканирования представлены и закодированы в градациях серого (показаны низкие и высокие значения, окрашенные от белого до темно-серого). Значения KD определяли с помощью биослойной интерферометрии.

Фигура 10: Анализ профиля экспрессии пептида, кодирующего исходный экзон MAGEA1, в различных нормальных, а также опухолевых тканях. Подробное описание фигуры см. в пояснении к фигуре 5.

Фигура 11: Анализ пептидного презентирования MAGEA1 в различных нормальных, а также опухолевых тканях. Подробное описание фигуры см. в пояснении к фигуре 6.

Фигура 12: Потенциальные нецелевые пептиды для направленного на PRAME-004 связывающего пептид:МНС полипептида, идентифицированные с помощью представленного способа. Показаны интенсивности сигнала MS, полученные после аффинной хроматографии с использованием направленного на PRAME-004 связывающего пептид:МНС полипептида в сравнении с интенсивностями сигнала MS, полученными после аффинной хроматографии с использованием специфического в отношении HLA-A*02 («панспецифического в отношении МНС») антитела BB7.2. Другие панспецифические в отношении HLA связывающие агенты, например, показанные в таблице 1, могут быть использованы аналогичным образом. Отношение степени извлечения индивидуальных пептидов между BB7.2 и связывающим агентом коррелирует с аффинностью связывания связывающего агента с этими пептидами (целевыми и нецелевыми).

Отношение интенсивностей сигналов соответствует расстоянию до диагонали (пунктирная линия) со слабо связывающими пептидами, расположенными в верхней левой части, и сильными связывающими пептидами, расположенными в нижней правой части. Стрелка указывает на PRAME-004. Аффинную хроматографию для всех связывающих агентов проводят таким образом, что используют большой избыток всех связывающих агентов. Таким образом, степень извлечения каждого пептида не ограничивается количеством доступных сайтов связывания. Почти количественное осаждение для связывающего пептид:МНС полипептида и специфического в отношении HLA-A*02 антитела BB7.2 дает максимальные значения около единицы, что означает, что пептиды,

которые четко распознаются связывающим агентом, появляются близко к диагональной линии. Градация серого представляет кратность снижения аффинности связывания относительно мишени, определяемое биослойной интерферометрией с использованием биосенсоров HIS1K, как описано в другом месте в настоящем документе. Для пептидов со связыванием ниже предела обнаружения биослойной интерферометрии кратность снижения аффинности связывания было установлено на 1000/0,1%.

Можно видеть, что оба подхода ((i) эксперимент по параллельному связыванию с рМНС-связывающим полипептидом и панспецифической в отношении МНС связывающей молекулой и (ii) биослойная интерферометрия) дают аналогичные результаты в отношении аффинности нецелевых пептидов. Интенсивность сигнала MS панспецифического в отношении МНС антитела не поддается количественной оценке для трех пептидов (например, IFIT1-001) из-за стохастичности масс-спектрометрических измерений при очень низких интенсивностях сигнала и поэтому обозначена на фигуре как «NA». Следовательно, для этих нецелевых пептидов невозможно рассчитать отношение. Однако эти однозначно идентифицированные пептиды после аффинной хроматографии также указывают на высоко релевантный нецелевой пептид, что подтверждается измерениями биослойной интерферометрии.

Затем можно установить пороговые значения на основе кратности снижения аффинности связывания для различения пептидов, с которыми направленный на PRAME-004 связывающий пептид:МНС полипептид является перекрестно-реактивным по сравнению с пептидами, перекрестная реактивность с которыми больше не считается слишком слабой и, следовательно, не релевантными. В общем, идентифицированные пептиды можно разделить на пептиды с сильным связыванием (кратность снижения аффинности связывания $\geq 0,1$), пептиды со средним связыванием ($0,01 \geq$ кратность снижения аффинности связывания $> 0,1$) и пептиды со слабым связыванием ($0,001 \geq$ кратность снижения аффинности связывания $> 0,01$).

Фигура 13: Корреляция кратности снижения аффинности связывания относительно мишени, определенная с помощью биослойной интерферометрии, с отношением площадей сигнала [рМНС-связывающий полипептид/BB7.2], определенная с помощью представленного способа. Корреляционный анализ (ранговая корреляция Спирмена) дал в результате значение rho 0,84. Экспоненциальную регрессию выполняли с использованием функции $f(x) = a - \exp(b*x-c)$. Полосы прогнозирования с вероятностью 95% показаны пунктирными линиями. Три пептида были обнаружены исключительно на матрице, связанной со связывающим пептид:МНС полипептидом, и поэтому невозможно было рассчитать соотношение интенсивностей сигналов. Значение установили на максимальное

обнаруженное значение. Для пептидов со связыванием ниже предела обнаружения кратность снижения аффинности связывания была установлена на 1000 для экспоненциальной регрессии.

Фигура 14: Демонстрация синтетической библиотеки пептид:МНС, используемой для идентификации соответствующих нецелевых пептидов. Показаны интенсивности сигналов MS, полученные после аффинной хроматографии с использованием направленного на PRAME-004 связывающего пептид:МНС полипептида против интенсивностей сигналов MS, полученных после аффинной хроматографии с использованием специфического в отношении HLA-A*02 антитела ВВ7.2. Отношение интенсивностей сигналов соответствует расстоянию до диагонали (пунктирная линия) со слабо связывающими пептидами, расположенными в верхней левой части, и сильными связывающими пептидами, расположенными в нижней правой части. Почти количественное осаждение для связывающего пептид:МНС полипептида и специфического в отношении HLA-A*02 антитела ВВ7.2 дает максимальные значения около единицы. Для демонстрации пять ранее идентифицированных нецелевых пептидов, целевых и два несвязывающих пептида изотопно метили, загружали на рекомбинантно полученный и повторно свернутый мономер МНС аллотипа HLA-A*02:01 и использовали в качестве синтетических добавок.

Фигура 15: Определение основанного на положении связывающего мотива направленного на PRAME-004 связывающего пептид:МНС полипептида с использованием представленного способа с синтетической пептидной библиотекой на основе позиционной мутации отдельных аминокислот целевого пептида. В этом случае все положения с 1 по 9, за исключением якорных остатков (AR), были заменены на аланин. Синтетические пептиды интегрировали в комплекс рМНС и добавляли к матрице клеточного лизата. Изображена кратность снижения аффинности связывания, определенная, как описано в другом месте, для каждого положения замены аминокислот. Максимальное значение было нормализовано к единице. Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение двух технических повторов. Полученный основанный на положении связывающий мотив в целом соответствует основанному на положении мотиву, определенному в сравнительном примере с использованием биослойной интерферометрии (фиг. 8). Представленный способ, по-видимому, имеет более высокую чувствительность, распознавая также слабо связывающиеся мутантные пептиды, что видно по относительно высокому отношению в положении 8. Хотя динамический диапазон у обоих способов различается, порядок отдельных слабо связывающихся пептидов согласуется с положением 5, которое является самым сильным распознаваемым положением, за которым следуют положения 7, 6 и 8. Это

также соответствует определенному суперординатному связывающему мотиву (фиг. 7), который показывает самую высокую селективность для положения 5, за которым следуют положения 7, 6 и 8. В соответствии с подходом позиционного сканирования, на фиг. 7 для положения 8 показана также пониженная селективность по глицину и ряду допустимых аминокислот.

Примеры

Пример 1:

Нацеленный МНС пептид, используемый в этом примере, который презентирован в контексте HLA-A*02, получают из антигена меланомы, предпочтительно экспрессируемого в опухолях (PRAME), и он характеризуется последовательностью SLLQHLIGL ((SEQ ID NO: 1), также в настоящем документе называется PRAME-004).

Связывающий пептид:МНС полипептид, используемый в этих экспериментах, проиллюстрировали модифицированной молекулой Т-клеточного рецептора, которую сконструировали так, чтобы она была растворимой, показала повышенную аффинность к пептиду PRAME-004 и дополнительно содержала фрагмент CD3-связывающего антитела.

Связывающий пептид:МНС полипептид, используемый в этих экспериментах, способ его получения и его технические характеристики раскрыты в РСТ/EP2020/050936, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

В качестве биологического источника смесей пептид:МНС использовали клеточную линию Т98G, производную от глиобластомы человека с высокой экспрессией HLA-A*02. Эту клеточную линию ранее протестировали в экспериментах на цитотоксичность с описанным связывающим пептид:МНС полипептидом, направленным против PRAME-004, и она показала положительное уничтожение.

Пятьсот миллионов клеток Т98G подвергали лизису в буфере, содержащем детергент CHAPS, и гомогенизировали с помощью ультразвуковой обработки.

Связывающий пептид:МНС полипептид присоединяли к твердой матрице Sepharose® в заранее определенном отношении с использованием химического присоединения после активации BrCN. Параллельно такое же количество Sepharose® также активировали для присоединения с использованием той же стратегии, но без добавления связывающего пептид:МНС полипептида. Вместо этого к Sepharose® добавляли 0,1 М раствор аминокислоты глицина, который вместо этого присоединился к химически активированным группам.

Лизат Т98G, содержащий смесь молекул пептид:МНС, затем наносили на две колонки для аффинной хроматографии, загруженные 200 мкл связанной с глицином

матрицы Sepharose[®] или 200 мкл матрицы Sepharose[®], связанной со связывающим пептид:МНС полипептидом. Таким образом, полученный от T98G лизат применяли таким образом, чтобы его сначала пропускали через связанную с глицином Sepharose[®] (именуемую в настоящем документе как глициновая колонка) для удаления или истощения любых пептидов, которые неспецифично связываются с колонкой или матрицей Sepharose[®] перед выделением пептидов, которые связываются со связывающим пептид:МНС полипептидом (фиг. 1). После промывки аффинных колонок PBS и ddH₂O связанные комплексы пептид:МНС элюировали из колонок с использованием трифторуксусной кислоты (TFA).

Во время этой стадии пептиды, связанные с МНС, также высвобождаются из фрагмента МНС и могут быть отделены от молекул с более высокой молекулярной массой путем ультрафильтрации с использованием определенных устройств с отсечкой по молекулярной массе менее 10 кДа.

Затем выделенные смеси пептидов окончательно подвергали масс-спектрометрии с сопряженной жидкостной хроматографией (ЖХ-МС) с использованием системы nanoACQUITY UPLC (Waters), а затем масс-спектрометра Orbitrap fusion[™] Tribrid[™] (Thermo Scientific).

Инструменты масс-спектрометрии работали в информационно-зависимом режиме (DDA) с использованием различных методов фрагментации (в данном примере фрагментация CID и HCD), а также считывания спектров MS/MS в двух разных анализаторах (в этом примере - анализаторах IonTrap и Orbitrap).

Спектры пептидных фрагментов сравнивали с протеомом человека с использованием модифицированной версии Международного белкового индекса (IPI v.378) и базы данных последовательностей Universal protein resource (UniProt) с поисковой системой SEQUEST. Все пептиды, элюированные и идентифицированные из глициновой колонки, исключали из дальнейшего анализа, поскольку они представляют собой неспецифические связывающие пептиды. Кроме того, из анализа удаляли известные примеси согласно внутренним базам данных и алгоритмам их идентификации.

Всего после выделения и обработки идентифицировали 20 пептидов, которые показаны в таблице 2. Для справки также показан целевой пептид PRAME-004, который, однако, не был идентифицирован среди выделенных пептидов, и не ожидалось, что он будет идентифицирован.

Чтобы подтвердить их релевантность и проанализировать силу связывания по сравнению с целевым пептидом, все пептиды подвергали биослойной интерферометрии. Измерения проводили с помощью биослойной интерферометрии (в данном случае система

Octet RED384 с настройками, рекомендованными производителем). Вкратце, кинетику связывания измеряли при 30°C и скорости встряхивания 1000 об/мин с использованием PBS, 0,05% Tween-20, 0,1% BSA в качестве буфера. Комплексы пептид:МНС загружали на биосенсоры (HIS1K) перед анализом серийных разведений пептид:МНС-специфических связывающих агентов. Отношение констант равновесной диссоциации (KD) по сравнению с PRAME-004 представлено в последнем столбце таблицы 2.

Выбор этих пептидов дополнительно протестировали в экспериментах на цитотоксичность. Вкратце, T2-клетки (10000 клеток на лунку), нагруженные 10 нМ соответствующих пептидов, инкубировали совместно с CD8+ Т-клетками человека (50000 клеток на лунку) в присутствии указанных концентраций специфического для PRAME-004 связывающего пептид:МНС полипептида (фиг. 4). Через 48 часов цитотоксичность определяли количественно путем измерения высвобождения LDH с использованием наборов для анализа нерадиоактивной цитотоксичности CytoTox 96 (PROMEGA). Соответствующие значения EC50 тестируемых пептидов также перечислены в таблице 2. Основным нецелевым пептидом, исходя из этого анализа, являлся IFT17-003, который показал аналогичные значения KD и EC50 для связывающего пептид:МНС полипептида по сравнению с целевым пептидом PRAME-004.

Данные о презентировании пептида XPRESIDENT® и экспрессии генов можно использовать для оценки потенциального риска безопасности нецелевых пептидов путем дифференциации релевантных нецелевых пептидов от менее релевантных нецелевых пептидов, которые презентированы/экспрессируются только в контексте других опухолевых тканей. В этом примере IFT17-003 считается весьма релевантным нецелевым пептидом из-за повсеместной экспрессии (фиг. 5) и презентирования (фиг. 6) пептида в различных нормальных тканях. Таким образом, комбинация представленных данных из этого примера с дополнительными крупномасштабными данными о презентировании или экспрессии пептидов имеет дополнительную ценность для оценки риска неспецифической в отношении мишени токсичности.

Для повышения специфичности связывающего пептид:МНС полипептида провели дополнительный цикл созревания с использованием идентифицированных пептидов в качестве детерминант отбора. Таким образом, специфичность вновь созданных молекул может быть значительно улучшена, что показано уменьшенным уничтожением линии отрицательных клеток-мишеней T98G на фиг. 2. Анализы уничтожения клеток в основном выполняли, как описано выше. Высвобождение LDH положительными или отрицательными клетками-мишенями (10000 клеток на лунку) определяли количественно после совместной инкубации с РВМС человека (100000 клеток на лунку) и указывали

концентрации связывающего пептид:МНС полипептида в течение 48 часов. Исходная молекула связывающего пептид:МНС полипептида, используемая для выделения пептида, показана закрашенными квадратами, тогда как варианты с улучшенной специфичностью показаны не закрашенными кружками. Контрольная молекула связывающего пептид:МНС полипептида (квадрат со звездочкой), и контроль без биспецифической молекулы (кружок со звездочкой) не вызывают гибели клеток-мишеней.

Таблица 2: Обзор идентифицированных специфических пептидов связывающего пептид:МНС полипептида. Сверху указан целевой PRAME-004. Указаны значения EC50 в экспериментах по цитотоксичности с использованием нагруженных пептидом клеток T2, а также аффинности связывания, определенные с помощью биослойной интерферометрии с использованием биосенсоров HIS1K.

Код пептида	Пептидная	EC50 [пМ]	Кратность снижения
	последовательность		аффинности связывания
PRAME-004	SLLQHLIGL (SEQ ID NO: 1)	1,2	1
IFT17-003	FMNPHLISV (SEQ ID NO: 2)	1,6	1
MCM5-006	MLAKHVITL (SEQ ID NO: 3)	16,1	3
IFIT1-001	VLLHHQIGL (SEQ ID NO: 4)	38,4	8
FADS2-001	LLLAHPIAL (SEQ ID NO: 5)	83,7	13
CTBP1-001	ALMYHTITL (SEQ ID NO: 6)	79,31	13
ITSN1-001	ILAMHLIDV (SEQ ID NO: 7)	1024	36
ATP1A1-001	FLPIHLLGL (SEQ ID NO: 8)	196	106
MCMB-002	YLILHLIST (SEQ ID NO: 9)	н/п	127
EHD4-001	ALAKHLIKI (SEQ ID NO: 10)	н/п	61

SF3B3-005	TLVYHVVG (SEQ ID NO: 11)	н/п	152
EHD-001	ALANHLIKV (SEQ ID NO: 12)	н/п	159
FARSA-001	LTGLHLMGV (SEQ ID NO: 13)	н/п	38
INTS7-002	ILGTHNITV (SEQ ID NO: 14)	н/п	57
MLXI-001	KLTSHAITL (SEQ ID NO: 15)	н/п	12
PPP4R1-003	HLMPHLLTL (SEQ ID NO: 16)	н/п	16
RIF1-004	AIWEKLISL (SEQ ID NO: 17)	н/п	156
SFXN3-001	SLTKHLPPL (SEQ ID NO: 18)	н/п	60
TBCK-002	ALSPHNILL (SEQ ID NO: 19)	н/п	142
TNRC6B-001	SLARHMLTL (SEQ ID NO: 20)	н/п	4
ZFYVE16-002	ALCPHLKTL (SEQ ID NO: 21)	н/п	33

Идентификация связывающего мотива

Идентифицированные пептиды можно дополнительно использовать для определения связывающего мотива для связывающего пептид:МНС полипептида, который предоставляет информацию о том, какие из аминокислот в пептидной последовательности имеют отношение к связыванию указанного полипептида.

Более того, дополнительную информацию о связывающем мотиве можно установить из аминокислот в релевантных положениях. На основании идентифицированного набора пептидов только подгруппа аминокислот допускается в положениях 1-9 аминокислотной последовательности (см. фиг. 7 и таблицу 3).

Таблица 3: Обзор допустимых аминокислот для каждого положения, идентифицированных представленным способом.

<i>Положение</i>	<i>Допустимые аминокислотные остатки</i>
1	A, S, F, I, L, H, K, M, T, V, Y
2	L, I, M, T
3	A, L, M, T, C, G, I, N, P, S, V, W
4	P, K, Y, A, E, G, H, I, L, M, N, Q, R, S, T
5	H, K
6	L, N, V, A, I, Q, T
7	I, L, M, K, P, V
8	T, G, S, K, A, D, L, P
9	L, V, I, T

В отличие от обычных подходов к сканированию аминокислот, в которых аминокислоты заменяют в отдельных положениях мутациями и затем тестируют в анализах *in vitro*, также можно выявить множественные замены с различными потенциально противоположными эффектами на общую силу связывания. Например, если замена в положении 6 природной аминокислотной последовательности приводит к снижению общей аффинности связывания, это может быть устранено аналогичной заменой в положении 8, которая может привести к сильному увеличению аффинности связывания связывающего пептид:МНС полипептида с молекулой пептид:МНС.

Сгенерированный таким образом связывающий мотив использовали для поиска в различных базах данных последовательностей белков (например, UniProt, IPI), чтобы найти дополнительные нецелевые пептиды, которые отражают и соответствуют ограничениям, налагаемым связывающим мотивом (т.е. определенные наборы аминокислот, которые допустимы в соответствующих положениях связывающего мотива).

Сравнительный пример 1

Следующие эксперименты показывают, как доступные в настоящее время способы в настоящей области техники не позволяют идентифицировать наиболее релевантные нецелевые пептиды, идентифицированные в примере 1, и, следовательно, не способны предсказать нежелательные побочные эффекты связывающих пептид:МНС полипептидов, предназначенных для введения *in vivo*.

Идентификация связывающего мотива с помощью позиционного сканирования:

Варианты нативной последовательности PRAME-004, в которой каждая аминокислота впоследствии заменяется аминокислотой аланином, тестировали на их способность связываться со связывающим пептид:МНС полипептидом с использованием биослойной интерферометрии.

A L L Q H L I G L (SEQ ID NO: 38)

S A L Q H L I G L (SEQ ID NO: 39)

S L A Q H L I G L (SEQ ID NO: 40)

S L L A H L I G L (SEQ ID NO: 41)

S L L Q A L I G L (SEQ ID NO: 42)

S L L Q H A I G L (SEQ ID NO: 43)

S L L Q H L A G L (SEQ ID NO: 44)

S L L Q H L I A L (SEQ ID NO: 45)

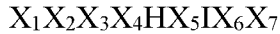
S L L Q H L I G A (SEQ ID NO: 46)

На фигуре 8 показаны результаты этих экспериментов. Пять из замещенных аланином пептидов приводят к 50% или более снижению аффинности связывания (или 2-кратному или большему увеличению KD соответственно) по сравнению с последовательностью дикого типа и, следовательно, считаются необходимыми для связывания. На основании этих результатов связывающий мотив мог представлять собой XXXXHLIGL (SEQ ID NO: 22), где X представляет собой любую аминокислоту.

В расширенном варианте подхода позиционного сканирования последовательность PRAME-004 заменяли в каждом положении любой из встречающихся в природе аминокислот аналогично описанному ранее. Единственной протеиногенной аминокислотой, которую не использовали для замены PRAME-004, являлся цистеин, поскольку известно, что эта аминокислота быстро претерпевает несколько химических модификаций, которые могут привести к ложным интерпретациям в отношении распознавания пептидов во время тестирования. Итак, всего исследовали $9 \cdot 18 = 162$ пептида.

Каждый пептид снова тестировали на его аффинность связывания с использованием биослойной интерферометрии (фиг. 9). Пептиды, которые приводят к 50% или большему снижению аффинности связывания (или 2-кратному или большему увеличению KD соответственно) по сравнению с последовательностью дикого типа, считались недопустимыми или вредными для связывания пептида. Это дало в результате

связывающий мотив комплекса с набором различных аминокислот, которые являются допустимыми или приемлемыми в положениях 1-9 аминокислотной последовательности:



где X_1 выбран из любой из ADEFGHIKLMNPQRSTVWY; X_2 выбран из любой из AFGILMQSTVY; X_3 выбран из любой из ADGIKLMNQSTVW; X_4 выбран из любой из AFGHIKLMNPQRSTVWY; X_5 выбран из любой из ILM; X_6 выбран из любой из GST; и X_7 выбран из любой из EFHIKLMNPQTVY.

Поиск сходства на основе связывающего мотива, полученного из аланинового сканирования:

Для поиска в различных базах данных последовательностей белков использовали собственный программный инструмент (IPI v. 3.78, Ensembl версии 77 GrCH38, включая в себя SNV, избыточную базу данных по белкам NCBI) для белков человека, которые содержат идентифицированную последовательность мотива (X-X-X-X-X-H-L-I-G-L) (SEQ ID NO: 22), в которой X может быть образован любой аминокислотой. Идентифицировали восемь уникальных пептидов: сам целевой пептид, PRAME-004 и семь пептидов, происходящих из различных белков человека: VEZT (везатин), HTR2C (рецептор 5-гидрокситриптамина 2C), HEPHL1 (гефестиноподобный белок 1), COL28A1 (альфа-1(XXVIII) цепь коллагена), SLC2A1 (представитель 1 семейства переносчиков растворенных веществ 2, облегченный глюкозный транспортер), SLC44A3 (белок 3, подобный переносчику холина), PIEZO2 (компонент 2 механочувствительного ионного канала пьезо-типа).

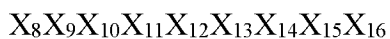
Аминокислотные последовательности этих пептидов показаны ниже.

Белок (учетный номер Uniprot)	Последовательность								
PRAME (P78395) (SEQ ID NO: 1)	S	L	L	Q	H	L	I	G	L
VEZT (Q9HBM0) (SEQ ID NO: 23)	H	P	S	Q	H	L	I	G	L
HTR2C (P28335) (SEQ ID NO: 32)	S	F	L	V	H	L	I	G	L
HEPHL1 (Q6MZM0) (SEQ ID NO: 33)	R	V	S	W	H	L	I	G	L
COL28A1 (Q2UY09) (SEQ ID NO: 34)	I	N	E	S	H	L	I	G	L
SLC2A1 (P11166) (SEQ ID NO: 35)	R	R	T	L	H	L	I	G	L
SLC44A3 (Q8N4M1) (SEQ ID NO: 36)	M	W	S	Y	H	L	I	G	L
PIEZO2 (Q9H5I5) (SEQ ID NO: 37)	F	T	A	G	H	L	I	G	L

Собственные данные об иммунопептидомах XPRESIDENT® из 592 образцов нормальной ткани и 710 образцов опухолевой ткани, все полученные от людей с типом HLA-A*02, показали, что ни один из 7 прогнозируемых нецелевых пептидов никогда не был идентифицирован для презентирования в контексте HLA-A*02 в любом из проанализированных образцов. Примечательно, что пептиды, производные от VEZT и SLC2A1, были ранее идентифицированы с помощью XPRESIDENT® на образцах тканей не-A*02-положительных индивидуумов, что позволяет предположить, что они презентированы различными аллотипами HLA (HLA-B*07 в случае пептида, производного от VEZT, и HLA-B*27 в случае пептида, производного от SLC2A1), и поэтому маловероятно, что они будут вызывать риск неспецифической в отношении мишени токсичности в контексте рестриктивного по HLA-A*02 связывающего пептид:МНС полипептида. Однако подход позиционного сканирования и прогнозирования не смог идентифицировать какие-либо релевантные нецелевые пептиды, которые можно было бы идентифицировать с помощью более совершенного способа, описанного в настоящей заявке.

Поиск сходства на основании суперординатного связывающего мотива:

Тот же собственный программный инструмент также использовали для прогнозирования пептидов, полученных из протеома человека, которые соответствуют критериям связывающего мотива комплекса. Поскольку цистеин был исключен во время замены, эта аминокислота, следовательно, была дополнительно разрешена для каждого положения в аминокислотной последовательности, что привело к следующему мотиву:



где X_8 выбран из любой из ACDEFGHIKLMNPQRSTVWY; X_9 выбран из любой из ACFGILMQSTVY; X_{10} выбран из любой из ACDGIKLMNQSTVW; X_{11} выбран из любой из ACFGHIKLMNPQRSTVWY; X_{12} выбран из любой из CH; X_{13} выбран из любой из CILM; X_{14} выбран из любой из CI; X_{15} выбран из любой из CGST; и X_{16} выбран из любой из CEFHIKLMRPQTVY.

В результате поиска получили общий перечень из 888 различных пептидов, отвечающих критериям связывающего мотива. Только два пептида (IFT17-003 и ATP1A1-001) перекрывались с перечнем релевантных нецелевых пептидов, идентифицированных превосходным способом, описанным в настоящей заявке в примере 1, тогда как остальные не были бы идентифицированы при подходе, основанном на прогнозировании, даже если бы все 888 пептидов впоследствии были бы протестированы в последующих анализах *in vitro*.

Пример 2:

Нацеленный МНС пептид, используемый в этом примере, который презентирован в контексте HLA-A*02, является производным от ассоциированных с меланомой антигенов A4 и A8 (MAGEA4/A8) и демонстрирует последовательность KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 24) в настоящем документе также называется MAGEA4/8.

Связывающий пептид:МНС полипептид состоит из модифицированной молекулы Т-клеточного рецептора, которая была сконструирована так, чтобы являться растворимой, и проявляет повышенную аффинность к пептиду, производному от MAGEA4/A8, и дополнительно содержит фрагмент связывающего CD3 антитела. В качестве биологического источника смеси пептид:МНС использовали линию клеток NCI-H1755, производную от линии клеток MAGEA4/8-положительной аденокарциномы легкого человека с высоким уровнем экспрессией HLA-A*02, NCI-H1755. Пятьсот миллионов клеток этой линии клеток подвергали лизису в буфере, содержащем детергент CHAPS, и гомогенизировали с помощью ультразвуковой обработки.

Связывание связывающего пептид:МНС полипептида и колонки для аффинной хроматографии проводили, как описано в примере 1. Перед нанесением лизата NCI-H1755, содержащего смесь молекул пептид:МНС, на связанную с глицином и со связывающим пептид:МНС связывающим агентом Sepharose[®], объем разделили пополам. Вторую половину объема обрабатывали параллельно другой матрице Sepharose[®], связанной с глицином, а затем параллельно матрице Sepharose[®], связанной со специфическим в отношении HLA-A*02 антителом BB7.2. Последний направлен на выделение полного спектра пептидов, презентированных HLA-A*02 в этой клеточной линии (см. также фиг. 1).

Пептиды элюировали со всех колонок и подвергали масс-спектрометрическому анализу, как показано в примере 1. Пептиды, элюированные с глициновых колонок, а также известные примеси снова исключали из дальнейшего анализа. Кроме того, все сигналы предшественников пептидов количественно определяли во всех различных экспериментах с использованием алгоритма SuperHirn (Mueller *et al.*, 2007). Характеристики извлекали и количественно оценивали в ходе всех масс-спектрометрических экспериментов с использованием окна фиксированного времени удерживания ± 3 мин и погрешности определения массы ± 5 м.д.

Рассчитывали отношения результирующей площади сигналов отдельных предшественников пептида от специфического в отношении MAGEA4/8 связывающего пептид:МНС полипептида к тем же сигналам предшественников от препарата BB7.2. Эти отношения отражают эффективность выделения специфического в отношении MAGEA4/8

связывающего пептид:МНС полипептида по сравнению со специфическим в отношении HLA-A*02 антителом ВВ7.2. Из-за высокой аффинности специфического в отношении MAGEA4/8 связывающего пептид:МНС полипептида к их мишени, а также к потенциально нецелевым пептидам, связанным с молекулой HLA-A*02, эффективность выделения этих пептидов намного выше по сравнению с ВВ7.2, который имеет аффинность в нижнем наномолярном диапазоне к HLA-A * 02, в значительной степени независимо от типа связанного пептида (Parham and Brodsky, 1981). Анализ данных масс-спектрометрии идентифицировал 10 пептидов, включая в себя целевой пептид MAGEA4/8 (см. таблицу 4). Ранжирование этих пептидов в соответствии с соотношением площадей связывающего пептид:МНС полипептида и ВВ7.2 позволяет определить эффективность выделения этих пептидов по сравнению с ВВ7.2, которая коррелирует с аффинностью связывания с использованием биослойной интерферометрии, как описано в примере 1. Таким образом, риск неспецифических в отношении мишеней токсичностей и потенциальные терапевтические окна между целевыми и нецелевыми пептидами может быть непосредственно выведены из количественных данных масс-спектрометрических экспериментов.

В представленном примере в таблице 4 соотношение площадей для MAGEA1 меньше по сравнению с целевым пептидом MAGEA4/8 (~ 11 по сравнению с ~ 10,6), что отражается в очень небольшом снижении аффинности связывания, составляющем 4,1. Напротив, для пептида HEAT5RA большое уменьшение соотношения площадей, приблизительно в 800 раз ниже по сравнению с MAGEA4/8, также отражается в значительно сниженной аффинности связывания, что составляет 238, по сравнению с MAGEA4/8.

Более глубокий анализ данных по презентированию пептидов и экспрессии генов в XPRESIDENT[®] показывает, что MAGEA1 не представляет значимого риска неспецифических в отношении мишеней токсичностей, поскольку он презентирован исключительно на раковых тканях (фиг. 10) и демонстрирует паттерн экспрессии, подобный раку яичка (фиг. 11).

Таблица 4: Обзор идентифицированных пептидов, специфических для связывающего пептид:МНС полипептида. Указано отношение пептидов, элюированных из связывающего MAGEA4/8 полипептида, к специфическому в отношении HLA-A*02 связывающему пептиду BB7.2 по данным масс-спектрометрии. В верхнем ряду представлен целевой пептид MAGEA4/A8, показывающий наивысшее соотношение площадей сигналов. Показатель РМВЕС является мерой сходства пептида с целевой последовательностью. Аффинности связывания определяли с помощью биослойной интерферометрии с использованием биосенсоров HIS1K.

Код пептида	Последовательность пептида	Соотношение площадей сигналов [связывающий MAGEA4/8 агент/BB7.2]	РМВЕС	Кратность снижения аффинности связывания
MAGEA4/A8	KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 24)	11	1,85568	1
MAGEA1	KVLEYVIKV (SEQ ID NO: 25)	10,615	1,42928	4,1
	KVLEFLAKV (SEQ ID NO: 26)	5,218	1,24828	
	KIIDLLPKV (SEQ ID NO: 27)	4,009	0,94598	
	KLQEFLQTL (SEQ ID NO: 28)	0,032	0,45866	
HEAT5RA	KVLETLVTV (SEQ ID NO: 29)	0,014	1,06691	237,7
FAM115A	KLGSVPVTV (SEQ ID NO: 30)	0,006	0,50865	503,1
	KIADFGWSV (SEQ ID NO: 31)	0,002	0,53985	

Пример 3:

Нацеленный МНС пептид, используемый в этом примере, является тем же, что был описан в примере 1 (PRAME-004, SEQ ID NO: 1). Связывающий пептид:МНС полипептид

был подобным образом проиллюстрирован молекулой модифицированного Т-клеточного рецептора, которая была сконструирована так, чтобы быть растворимой и показала повышенную аффинность к пептиду PRAME-004 и дополнительно содержала фрагмент CD3-связывающего антитела, но другой вариант по сравнению с примером 1, что приводит к изменениям в нецелевом распознавании.

В качестве биологического источника смесей пептид:МНС использовали пул из десяти различных клеточных линий. Клеточные линии отбирали для максимального увеличения количества и разнообразия пептида HLA-A*02:01. Пятьсот миллионов клеток на клеточную линию подвергали лизису в буфере, содержащем детергент CHAPS, и гомогенизировали и объединяли. Для индивидуальных анализов использовали аликвоты с количеством клеток порядка пятисот миллионов.

Присоединение и аффинную хроматографию связывающего пептид:МНС полипептида и специфического в отношении HLA-A*02 антитела BB7.2 проводили, как описано в примере 2, но для увеличения времени контакта лизата и присоединенного к матрице связывающего пептид:МНС полипептида инкубацию выполняли при встряхивании реакционной пробирки в течение 16 часов.

Всего после выделения и обработки идентифицировали 79 пептидов. Десять наиболее релевантных нецелевых пептидов показаны в таблице 5, включая в себя целевой пептид PRAME-004. 32 из 79 пептидов показали низкое соотношение интенсивностей сигналов [pМНС-связывающий полипептид/BB7.2] (ниже 0,005), и поэтому ожидалось, что они будут иметь низкое связывание или отсутствие связывания со связывающим пептид:МНС полипептидом. Эти пептиды были включены в дальнейший анализ в качестве эталонов. Выбранные пептиды показаны на фиг. 12 в соответствии с полученными интенсивностями сигналов MS после очистки с использованием связывающего пептид:МНС полипептида по сравнению с интенсивностями сигналов MS после очистки с использованием специфического в отношении HLA-A*02 антитела BB7.2. Расстояние до диагонали представляет собой отношение интенсивностей сигналов. Для целевых и сильно нецелевых пептидов ожидается, что почти количественная аффинная хроматография давала в результате отношение интенсивностей сигналов [pМНС-связывающий полипептид/BB7.2] около единицы (пунктирная линия). На графике отображены названия десяти самых сильных связывающих нецелевых пептидов, все они лежат близко к диагонали, как и ожидалось. Пептиды с очень низким отношением интенсивностей сигналов [pМНС-связывающий полипептид/BB7.2] действительно показали чрезвычайно большую или не поддающуюся количественному измерению кратность снижения

аффинности связывания с использованием биослойной интерферометрии в качестве эталона.

Таблица 5: Обзор десяти наиболее релевантных нецелевых пептидов на основе их кратности снижения аффинности связывания, определенной с помощью биослойной интерферометрии с использованием биосенсоров HIS1K. Указано отношение пептидов, элюированных из связывающего PRAME-004 полипептида, к специфическому в отношении HLA-A*02 связывающему пептиду BB7.2 по данным масс-спектрометрии. Для значений, отмеченных звездочкой, отношение не могло быть рассчитано из-за низкого содержания пептидов, элюированных из специфического в отношении HLA-A*02 связывающего пептида, и было принято максимальное измеренное значение.

Код пептида	Последовательность пептида	Соотношение площадей сигналов [связывающий PRAME агент/BB7.2]	Кратность снижения аффинности связывания
PRAME-004	SLLQHLIGL (SEQ ID NO: 1)	0,9	1,0
IFT17-003	FMNPHLISV (SEQ ID NO: 2)	0,8	1,0
MCM5-006	MLAKHVITL (SEQ ID NO: 3)	3,1	2,4
IFIT1-001	VLLHHQIGL (SEQ ID NO: 4)	3,1*	8,1
MLXI-001	KLTSHAITL (SEQ ID NO: 15)	3,1*	9,2
CTBP1-001	ALMYHTITL (SEQ ID NO: 6)	1,0	10,6
PPP4R1-003	HLMPHLLTL (SEQ ID NO: 16)	1,4	13,0
TUB-006	YMNNDLIGL (SEQ ID NO: 47)	2,0	13,1
FADS2-001	LLLAHPIAL (SEQ ID NO: 5)	0,3	13,6

СТВР2-001	АММУНТТЛ (SEQ ID NO: 48)	1,4	15,8
-----------	-----------------------------	-----	------

Чтобы подтвердить их релевантность и проанализировать силу связывания по сравнению с целевым пептидом, все пептиды подвергали биослойной интерферометрии, как описано в примере 1. Определили отношение констант равновесной диссоциации (KD) по сравнению с PRAME-004 и провели корреляцию с отношением интенсивностей сигналов [pMHC-связывающий полипептид/BB7.2], что определяли с помощью представленного способа. Определенная кратность снижения аффинности связывания показана градацией серого на фигуре 12. Корреляция кратности снижения аффинности связывания с отношением интенсивностей сигналов [pMHC-связывающий полипептид/BB7.2], что определяли с помощью представленного способа, продемонстрирована на фигуре 13. Как обсуждалось выше, пептиды с сильным связыванием со связывающим пептид:МНС полипептидом могут быть идентифицированы с высоким отношением интенсивностей сигналов [pMHC-связывающий полипептид/BB7.2], в то время как несвязывающие пептиды показали отношения интенсивностей сигналов [pMHC-связывающий полипептид/BB7.2] ниже 0,001. Чтобы получить максимальную чувствительность способа, связывающий пептид:МНС полипептид и специфическое в отношении HLA-A*02 антитело BB7.2 применяют в избытке, что приводит к почти количественной экстракции нецелевых пептидов в обоих случаях и к максимальному отношению площадей сигналов [pMHC-связывающий полипептид/BB7.2] около единицы. Чтобы учесть этот эффект насыщения, провели экспоненциальную регрессию (фиг. 13).

Данные показывают, что аффинности связывания можно оценить с использованием отношения интенсивностей сигналов одного эксперимента с применением представленного способа.

Пример 4:

Нацеленный МНС пептид, используемый в этом примере, является тем же, что был описан в примере 1 (PRAME-004, SEQ ID NO: 1). Связывающий пептид:МНС полипептид подобным образом проиллюстрировали молекулой модифицированного Т-клеточного рецептора, которая была сконструирована так, чтобы быть растворимой и показала повышенную аффинность к пептиду PRAME-004 и дополнительно содержала фрагмент CD3-связывающего антитела, но другой вариант по сравнению с примером 1 и 3.

Чтобы продемонстрировать способность представленного способа идентифицировать потенциальные нецелевые пептиды из синтетической пептидной библиотеки, смесь восьми изотопно меченых комплексов пептид:МНС добавляли в точном количестве в биологическую матрицу, полученную из образца ткани почечно-клеточной карциномы. Для эксперимента 0,3 г ткани лизировали, как описано выше, и добавляли 2 пмоль комплексов пептид:МНС. Лизат разделяли на равные части и подвергали аффинной хроматографии с использованием связывающего пептид:МНС полипептида и специфического в отношении HLA-A*02 антитела BB7.2. Меченые изотопами пептиды состояли из целевого пептида, пяти известных перекрестно-реактивных пептидов и двух несвязывающихся пептидов в качестве отрицательного контроля (таблица 6).

Области сигналов связывающего PRAME полипептида по сравнению со специфическим в отношении HLA-A*02 антителом BB7.2 отображены на фиг. 14. Как и ожидалось, целевые и уже известные нецелевые пептиды показывают высокое отношение областей сигналов [pМНС-связывающий полипептид/BB7.2] в порядке величины около единицы и, следовательно, будут классифицированы как очень релевантные с помощью представленного способа. Аналогичным образом, оба пептида отрицательного контроля показывают очень низкое отношение областей сигналов [pМНС-связывающий полипептид/BB7.2], и поэтому их можно было бы рассматривать как менее релевантные на основе представленного способа.

Таблица 6: Обзор добавленных в точном количестве модифицированных изотопно меченных комплексов пептид:МНС. Аминокислота с изотопной меткой обозначена звездочкой. Указано отношение пептидов, элюированных из связывающего PRAME полипептида к специфическому в отношении HLA-A*02 связывающему пептиду BB7.2 по данным масс-спектрометрии. В верхнем ряду представлен целевой пептид PRAME-004, за которым следуют пять уже известных нецелевых пептидов и два несвязывающихся пептида отрицательного контроля. Показатель PMBEC является мерой сходства пептида с целевой последовательностью. Аффинности связывания определяли с помощью биослойной интерферометрии с использованием биосенсоров HIS1K.

Код пептида	Последовательность пептида	Соотношение площадей сигналов [связывающий PRAME агент/BB7.2]	PMBEC	
PRAME-004*	SLL*QHLIGL (SEQ ID NO: 1)	0,5422	1,60	целевой

IFIT1-001*	VL*LHHQIGL (SEQ ID NO: 4)	1,4524	1,08	нецелевой
ATP-009*	HLLMHLI*GS (SEQ ID NO: 49)	2,3194	1,05	нецелевой
FADS2-001*	L*LLAHPIAL (SEQ ID NO: 5)	0,5232	0,99	нецелевой
MCM5-006*	ML*AKHVITL (SEQ ID NO: 3)	1,7379	0,76	нецелевой
IFT17-003*	FMNPHL*ISV (SEQ ID NO: 2)	0,9949	0,75	нецелевой
GAL-001*	SL*DPSSPQV (SEQ ID NO: 50)	0,0015	0,31	отр. контроль
KLHL14-001*	VLDDSIYL*V (SEQ ID NO: 51)	0,0016	0,21	отр. контроль

Пример 5:

Нацеленный МНС пептид, используемый в этом примере, является тем же, что был описан в примере 1 (PRAME-004, SEQ ID NO: 1). Связывающий пептид:МНС полипептид подобным образом проиллюстрировали молекулой модифицированного Т-клеточного рецептора, которая была сконструирована так, чтобы быть растворимой и показала повышенную аффинность к пептиду PRAME-004 и дополнительно содержала фрагмент CD3-связывающего антитела.

Чтобы продемонстрировать дополнительный подход представленного способа для получения информации о связывающем мотиве связывающего пептид:МНС полипептида, синтетические пептидные варианты целевого пептида использовали в качестве вводимой в точном количестве библиотеки. В этом подходе каждое положение аминокислоты, релевантное для распознавания связывающим пептид:МНС полипептидом, заменяли («сканировали») индивидуально аланином (SEQ ID NO: 38-46). Релевантными положениями в этом примере являлись все положения (с 1 по 9) без якорных аминокислот во втором и девятом положениях, которые являются критически важными для связывания пептида с МНС. Синтетические пептиды загружали на рекомбинантно полученные и повторно уложенные молекулы МНС аллотипа HLA-A*02:01 и добавляли в точном количестве биологическую матрицу, полученную из образца ткани почечно-клеточной карциномы. Для эксперимента 0,1 г ткани лизировали, как описано выше, и добавляли 140

фмоль комплексов пептид:МНС. Лизат разделяли на равные части и подвергали аффинной хроматографии с использованием связывающего пептид:МНС полипептида и специфического в отношении HLA-A*02 антитела BB7.2. Количественный анализ пептидов проводили с использованием нецеленного масс-спектрометрического измерения.

Как описано ранее, отношение интенсивности сигнала рМНС-связывающего полипептида, нацеленного на PRAME, к специфическому в отношении HLA-A*02 антителу BB7.2 рассчитывали как оценку аффинности связывания. Полученные отношения интенсивностей MS-сигналов показаны на фигуре 15. Отношения были нормализованы до максимального значения для лучшего сравнения с сравнительным примером на фигуре 8 с использованием измерений биослойной интерферометрии. В соответствии с сравнительным примером определения основанного на положении связывающего мотива (фиг. 8), положения 1,3 и 4 не имеют отношения к связыванию с комплексом рМНС. Представленный способ, по-видимому, имеет более высокую чувствительность к распознаванию также слабо связывающихся мутантных пептидов, которые можно увидеть, например, от относительно высокого отношения в положении 8, что указывает на другой динамический диапазон представленного способа. Однако порядок отдельных пептидов согласуется с положением 5, которое является наиболее распознаваемым положением, за которым следуют положения 7, 6 и 8. Согласно данным, положение 8 не считается релевантным для связывания, хотя соотношение интенсивностей сигналов MS заметно снижается. Это также соответствует определенному суперординатному связывающему мотиву (фиг. 7), который показывает в положении 8 пониженную селективность в отношении глицина и ряда других допустимых аминокислот. Сравнение с фигурой 7 также показывает, что положение 5 является наиболее релевантным положением для связывания, что также очень хорошо отражается в представленном основанном на положении связывающем мотиве.

Расширение вводимой в точном количестве библиотеки за счет включения других заменяющих аминокислот помимо аланина могло бы увеличить информацию, полученную о связывающем мотиве в одном эксперименте. Более того, синтетические библиотеки, содержащие от сотен до тысяч встречающихся в природе пептидов, могут применяться в качестве синтетической библиотеки. Одним из основных преимуществ продемонстрированного аспекта представленного способа является то, что соответствующие аффинности связывания могут быть определены параллельно.

Сокращения

AR	Якорные остатки
APC	Антигенпрезентирующие клетки
BIRD	Инфракрасная радиационная диссоциация черного тела
BiTE	Биспецифический активатор Т-клеток
CAR	Химерные антигенные рецепторы
CDR	Определяющие комплементарность области
CID	Индукцированная столкновениями диссоциация
DART	Переориентирующееся антитело с двойной аффинностью
DDA	Информационно-зависимое получение данных
DIA	Информационно-независимое получение данных
DRIP	Дефектные рибосомальные частицы
ECD	Диссоциация с захватом электронов
EDD	Диссоциация с отрывом электрона
ETCID	Индукцированная переносом электрона и столкновениями диссоциация
ETD	Диссоциация с переносом электрона
ETHCD	Диссоциация с переносом электрона/столкновением с более высокой энергией
HCD	Диссоциация, индуцированная столкновениями с более высокой энергией
IRMPD	Инфракрасная многофотонная диссоциация
IQR	Межквартильный размах
KD	Константа диссоциации
NETD	Диссоциация с переносом отрицательного электрона
LDH	Лактатдегидрогеназа
PBMC	Мононуклеарные клетки периферической крови
SID	Индукцированная столкновениями с поверхностью диссоциация
SMITE	Одновременное множественное взаимодействие с Т-клетками
TandAb	Тандемное антитело
TCR	Т-клеточный рецептор
TFA	Трифторуксусная кислота
TIL	Инфильтрирующие опухоль лимфоциты

ССЫЛКИ

Barnstable CJ, Bodmer WF, Brown G, Galfre G, Milstein C, Williams AF, Ziegler A (1978). Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. *Cell* *14*, 9-20.

Berger AE, Davis JE, Cresswell P (1982). Monoclonal antibody to HLA-A3. *Hybridoma* *1*, 87-90.

Bijen HM, van der Steen DM, Hagedoorn RS, Wouters AK, Wooldridge L, Falkenburg JHF, Heemskerk MHM (2018). Preclinical Strategies to Identify Off-Target Toxicity of High-Affinity TCRs. *Mol Ther* *26*, 1206-1214.

Birnbaum ME, Mendoza JL, Sethi DK, Dong S, Glanville J, Dobbins J, Ozkan E, Davis MM, Wucherpfennig KW, Garcia KC (2014). Deconstructing the peptide-MHC specificity of T cell recognition. *Cell* *157*, 1073-1087.

Ekeruche-Makinde J, Miles JJ, van den Berg HA, Skowera A, Cole DK, Dolton G, Schauenburg AJ, Tan MP, Pentier JM, Llewellyn-Lacey S, *et al.* (2013). Peptide length determines the outcome of TCR/peptide-MHCI engagement. *Blood* *121*, 1112-1123.

Jahn L, van der Steen DM, Hagedoorn RS, Hombrink P, Kester MG, Schoonakker MP, de Ridder D, van Veelen PA, Falkenburg JH, Heemskerk MH (2016). Generation of CD20-specific TCRs for TCR gene therapy of CD20low B-cell malignancies insusceptible to CD20-targeting antibodies. *Oncotarget* *7*, 77021-77037.

Karlin S, Altschul SF (1993). Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 5873-5877.

Kim Y, Sidney J, Pinilla C, Sette A, Peters B (2009). Derivation of an amino acid similarity matrix for peptide: MHC binding and its application as a Bayesian prior. *BMC Bioinformatics* *10*, 394.

Kolstad A, Hansen T, Hannestad K (1987). A human-human hybridoma antibody (TrB12) defining subgroups of HLA-DQw1 and -DQw3. *Hum Immunol* *20*, 219-231.

Lampson LA, Levy R (1980). Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line. *J Immunol* *125*, 293-299.

Linette GP, Stadtmauer EA, Maus MV, Rapoport AP, Levine BL, Emery L, Litzky L, Bagg A, Carreno BM, Cimino PJ, *et al.* (2013). Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma. *Blood* *122*, 863-871.

Maeda H, Hirata R (1984). Separation of four class II molecules from DR2 and DRw6 homozygous B lymphoid cell lines. *Immunogenetics* *20*, 639-647.

Morgan RA, Chinnasamy N, Abate-Daga D, Gros A, Robbins PF, Zheng Z, Dudley ME, Feldman SA, Yang JC, Sherry RM, *et al.* (2013). Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy. *J Immunother* 36, 133-151.

Mueller LN, Rinner O, Schmidt A, Letarte S, Bodenmiller B, Brusniak MY, Vitek O, Aebersold R, Muller M (2007). SuperHirn - a novel tool for high resolution LC-MS-based peptide/protein profiling. *Proteomics* 7, 3470-3480.

Parham P, Brodsky FM (1981). Partial purification and some properties of BB7.2. A cytotoxic monoclonal antibody with specificity for HLA-A2 and a variant of HLA-A28. *Hum Immunol* 3, 277-299.

Raman MC, Rizkallah PJ, Simmons R, Donnellan Z, Dukes J, Bossi G, Le Provost GS, Todorov P, Baston E, Hickman E, *et al.* (2016). Direct molecular mimicry enables off-target cardiovascular toxicity by an enhanced affinity TCR designed for cancer immunotherapy. *Sci Rep* 6, 18851.

Rebai N, Mercier P, Kristensen T, Devaux C, Malissen B, Mawas C, Pierres M (1983). Murine H-2Dd-reactive monoclonal antibodies recognize shared antigenic determinant(s) on human HLA-B7 or HLA-B27 molecules or both. *Immunogenetics* 17, 357-370.

Smith SN, Wang Y, Baylon JL, Singh NK, Baker BM, Tajkhorshid E, Kranz DM (2014). Changing the peptide specificity of a human T-cell receptor by directed evolution. *Nat Commun* 5, 5223.

Spits H, Keizer G, Borst J, Terhorst C, Hekman A, de Vries JE (1983). Characterization of monoclonal antibodies against cell surface molecules associated with cytotoxic activity of natural and activated killer cells and cloned CTL lines. *Hybridoma* 2, 423-437.

Stewart-Jones G, Wadle A, Hombach A, Shenderov E, Held G, Fischer E, Kleber S, Nuber N, Stenner-Liewen F, Bauer S, *et al.* (2009). Rational development of high-affinity T-cell receptor-like antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 5784-5788.

Stone JD, Kranz DM (2013). Role of T cell receptor affinity in the efficacy and specificity of adoptive T cell therapies. *Front Immunol* 4, 244.

van den Berg JH, Gomez-Eerland R, van de Wiel B, Hulshoff L, van den Broek D, Bins A, Tan HL, Harper JV, Hassan NJ, Jakobsen BK, *et al.* (2015). Case report of a fatal Serious Adverse Event upon administration of T cells transduced with a MART-1 specific T cell receptor. *Mol Ther*.

Zhou XX, Zeng WF, Chi H, Luo C, Liu C, Zhan J, He SM, Zhang Z (2017). pDeep: Predicting MS/MS Spectra of Peptides with Deep Learning. *Anal Chem* 89, 12690-12697.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ определения характеристик связывания молекулы полипептида, содержащей по меньшей мере один определенный пептидсвязывающий домен («pMHC-связывающий полипептид»), с пептидом («целевой пептид») комплекса пептид:MHC, предусматривающий:

a) получение образца, содержащего по меньшей мере один анализируемый комплекс пептид:MHC,

b) приведение в контакт указанного образца с указанной молекулой полипептида («pMHC-связывающий полипептид») и обеспечение возможности связывания указанного по меньшей мере одного пептидсвязывающего домена указанной молекулы полипептида с указанным по меньшей мере одним комплексом пептид:MHC,

c) выделение указанного по меньшей мере одного комплекса пептид:MHC, связанного с указанным по меньшей мере одним пептидсвязывающим доменом, и

d) идентификация указанного пептида указанного по меньшей мере одного комплекса пептид:MHC, выделенного на стадии c), и тем самым идентификация связывания указанной молекулы полипептида с указанным пептидом указанного по меньшей мере одного комплекса пептид:MHC.

2. Способ по п. 1, при котором указанная молекула полипептида необязательно прикреплена к матричному материалу и/или при котором указанная молекула полипептида дополнительно содержит по меньшей мере один сайт прикрепления, связывающийся с матричным материалом или прикрепленный к нему.

3. Способ по п. 1 или 2, при котором определение характеристик связывания молекулы полипептида с пептидом комплекса пептид:MHC предусматривает идентификацию связывания молекулы полипептида с указанным пептидом комплекса пептид:MHC.

4. Способ по любому из пп. 1-3, при котором указанный образец выбран из природных или искусственных образцов, содержащих по меньшей мере один комплекс пептид:MHC, таких как клеточный лизат, или образец, содержащий очищенные или обогащенные комплексы пептид:MHC.

5. Способ по любому из пп. 1-4, при котором указанная молекула полипептида, содержащая указанный по меньшей мере один пептидсвязывающий домен, выбрана из биспецифических, триспецифических, тетраспецифических или мультиспецифических молекул.

6. Способ по любому из пп. 1-5, при котором указанная молекула полипептида, содержащая указанный по меньшей мере один пептидсвязывающий домен, представляет собой или происходит от молекулы, выбранной из следующего: антитело, биспецифическое антитело с одновременным множественным взаимодействием с Т-клетками (SMITE), биспецифический активатор Т-клеток (BiTE), scFV, диатело, переориентирующееся антитело с двойной аффинностью (DART), тандемное антитело (TandAb), растворимый TCR, scTCR, мутированный TCR, например, содержащий S-мостики, усеченный TCR и слитая молекула биспецифического Т-клеточного рецептора (TCR) и антитела.

7. Способ по любому из пп. 1-6, при котором указанная молекула полипептида содержит по меньшей мере один второй связывающий домен, который выбран из домена, связывающегося с молекулой клеточной поверхности, которая, как известно, индуцирует активацию иммунных клеток, и молекулами, связанными с иммунным ответом, причем предпочтительно второй связывающий домен связывается с CD3 или одной из его цепей, таких как цепи CD3 γ , CD3 δ и CD3 ϵ , CD4, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD18, CD22, CD25, CD28, CD32a, CD32b, CD33, CD41, CD41b, CD42a, CD42b, CD44, CD45RA, CD49, CD55, CD56, CD61, CD64, CD68, CD94, CD90, CD117, CD123, CD125, CD134, CD137, CD152, CD163, CD193, CD203c, CD235a, CD278, CD279, CD287, Nkp46, NKG2D, GITR, Fc ϵ RI, TCR α/β , TCR γ/δ и/или HLA-DR.

8. Способ по любому из пп. 1-7, при котором указанная молекула полипептида, содержащая указанный по меньшей мере один пептидсвязывающий домен, представляет собой биспецифическую молекулу, содержащую пептидсвязывающий домен, который происходит от Т-клеточного рецептора (TCR).

9. Способ по любому из пп. 1-8, при котором указанная молекула полипептида, содержащая указанный по меньшей мере один пептидсвязывающий домен, представляет собой растворимую молекулу.

10. Способ по любому из пп. 2-9, при котором сайт прикрепления расположен по меньшей мере в одном связывающем домене, по меньшей мере в одном втором домене или представляет собой отдельную группу прикрепления и по существу не препятствует связыванию указанной молекулы.

11. Способ по любому из пп. 1-10, при котором указанная идентификация на стадии d) предусматривает способ, выбранный из масс-спектрометрии и секвенирования пептидов.

12. Способ по любому из пп. 1-11, при котором определение характеристики связывания молекулы полипептида с пептидом комплекса пептид:МНС предусматривает идентификацию суперординатного связывающего мотива для указанного связывающего пептид:МНС домена.

13. Способ по любому из пп. 1-12, при котором определение характеристик связывания молекулы полипептида с пептидом комплекса пептид:МНС предусматривает следующее:

а) идентификация основанного на положении и/или суперординатного связывающего мотива молекулы полипептида для указанного связывающего пептид:МНС домена, и/или

б) идентификация нецелевых пептидов молекулы полипептида для связывающих пептид:МНС доменов с использованием пептидов, идентифицированных в представленной заявке.

14. Способ по любому из пп. 1-13, при котором определение характеристик связывания молекулы полипептида с пептидом комплекса пептид:МНС предусматривает исследование и/или идентификацию перекрестной реактивности указанного пептида для других связывающих пептид:МНС доменов.

15. Способ по любому из пп. 1-14, дополнительно предусматривающий стадию идентификации презентирования указанного пептидного мотива или пептидных мотивов на раковых и/или незлокачественных клетках или тканях.

16. Способ по любому из пп. 1-15, причем указанный способ дополнительно предусматривает добавление к указанному образцу на стадии а) по меньшей мере следующего:

один пептид с известной последовательностью и/или один определенный и/или предварительно выбранный комплекс пептид:МНС, пептид которого характеризуется известной последовательностью, предпочтительно в заранее определенном количестве («добавление точного количества»).

17. Способ по п. 16, при котором последовательность указанного пептида изменяют или мутируют относительно последовательности пептида («целевой пептид») комплекса пептид:МНС, с которым связывается молекула полипептида, содержащая по меньшей мере один определенный пептидсвязывающий домен («рМНС-связывающий полипептид»).

18. Способ по п. 16 или 17, при котором серию мутантов пептида («целевой пептид») комплекса пептид:МНС, с которым связывается молекула полипептида, содержащая по меньшей мере один определенный пептидсвязывающий домен («рМНС-связывающий полипептид»), создают и добавляют к образцу на стадии а), причем каждый мутант содержит по всей своей длине или по меньшей мере по ее субфракции аминокислотный остаток в одном положении, замещенный на альтернативную аминокислоту.

19. Способ по любому из пп. 16-18, при котором каждый мутант содержит по всей своей длине или по меньшей мере по ее субфракции аминокислотный остаток в одном положении, замещенный на аланин или глицин.

20. Способ по любому из пп. 16-19, при котором якорные положения пептида («целевой пептид») комплекса пептид:МНС, с которым связывается молекула полипептида, содержащая по меньшей мере один определенный пептидсвязывающий домен («рМНС-связывающий полипептид»), не являются измененными/мутированными.

21. Способ по любому из пп. 2-20, при котором указанный матричный материал выбирают из Sepharose® или агарозы.

22. Способ по любому из пп. 1-21, причем что указанный способ дополнительно предусматривает приведение в контакт указанного образца на стадии b) и/или c) с одной или несколькими молекулами других связывающих доменов, такими как, например, широкоспецифические TCR и/или антитела.

23. Способ по п. 22, при котором по меньшей мере одна широкоспецифическая молекула связывающего домена представляет собой панспецифическую в отношении МНС связывающую молекулу, которая обладает специфичностью связывания с одной или несколькими молекулами МНС отдельно, независимо от связанного с ней пептида.

24. Способ по п. 21 или 22, при котором:

(i) первую фракцию образца приводят в контакт с рМНС-связывающим полипептидом, и

(ii) вторую фракцию образца приводят в контакт с другим рМНС-связывающим полипептидом или панспецифической в отношении МНС связывающей молекулой,

и при котором дополнительно после выделения комплексов пептид:МНС, связанных с рМНС-связывающим полипептидом и другим рМНС-связывающим полипептидом или панспецифической в отношении МНС связывающей молекулой, сравнивают эффективности выделения, достигнутые в двух фракциях.

25. Способ по любому из пп. 1-24, при котором на стадии b) или c) наносят большой избыток рМНС-связывающих полипептидов и необязательно панспецифических в отношении МНС связывающих молекул.

26. Способ по любому из пп. 24-25, при котором аффинности связывания связывающих агентов (связывающих полипептидов или связывающих молекул), используемых в первой и второй фракциях, к различным пептидам в образце определяют на основании сравнения эффективностей выделения.

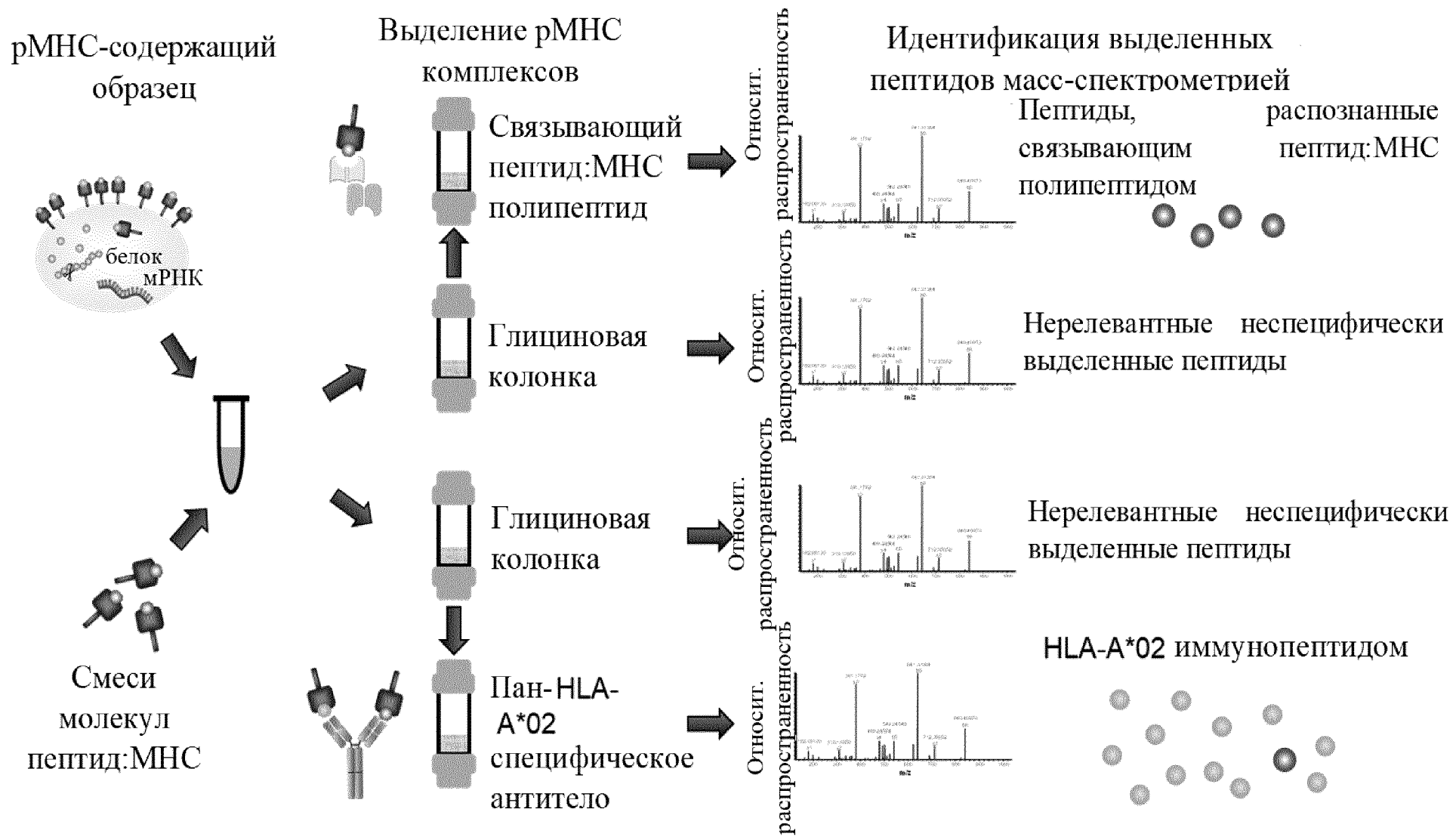
27. Способ по любому из пп. 1-26, при котором по меньшей мере одна молекула в указанном способе содержит детектируемый маркер или метку.

28. Способ по любому из пп. 1-27, дополнительно предусматривающий вычислительный анализ указанной идентификации и/или нецелевого связывания.

29. Способ по любому из пп. 14-28, при котором перекрестную реактивность для указанного связывающего пептид:МНС домена дополнительно исследуют по меньшей мере в одном эксперименте по цитотоксичности.

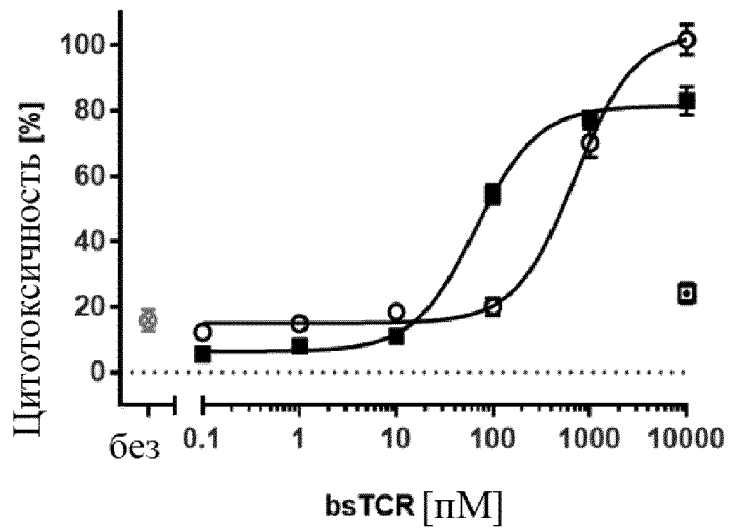
30. Набор, содержащий материалы для выполнения способа по любому из пп. 1-29, такие как, например, а) матричный материал и б) молекулы полипептида, содержащие указанный по меньшей мере один пептидсвязывающий домен, связывающийся по меньшей мере с одним комплексом пептид:МНС.

31. Молекула полипептида, содержащая по меньшей мере один определенный пептидсвязывающий домен («рМНС-связывающий полипептид»), связывание которой с пептидом («целевой пептид») комплекса пептид:МНС охарактеризовано способом по любому из пп. 1-29.

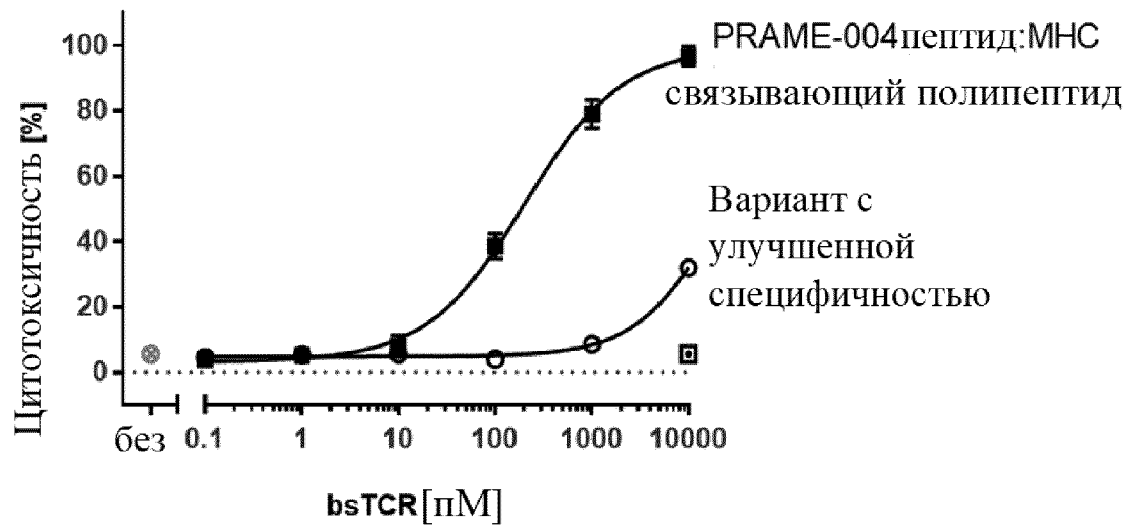


ФИГУРА 1

U2OS
(PRAME-004 положительный)

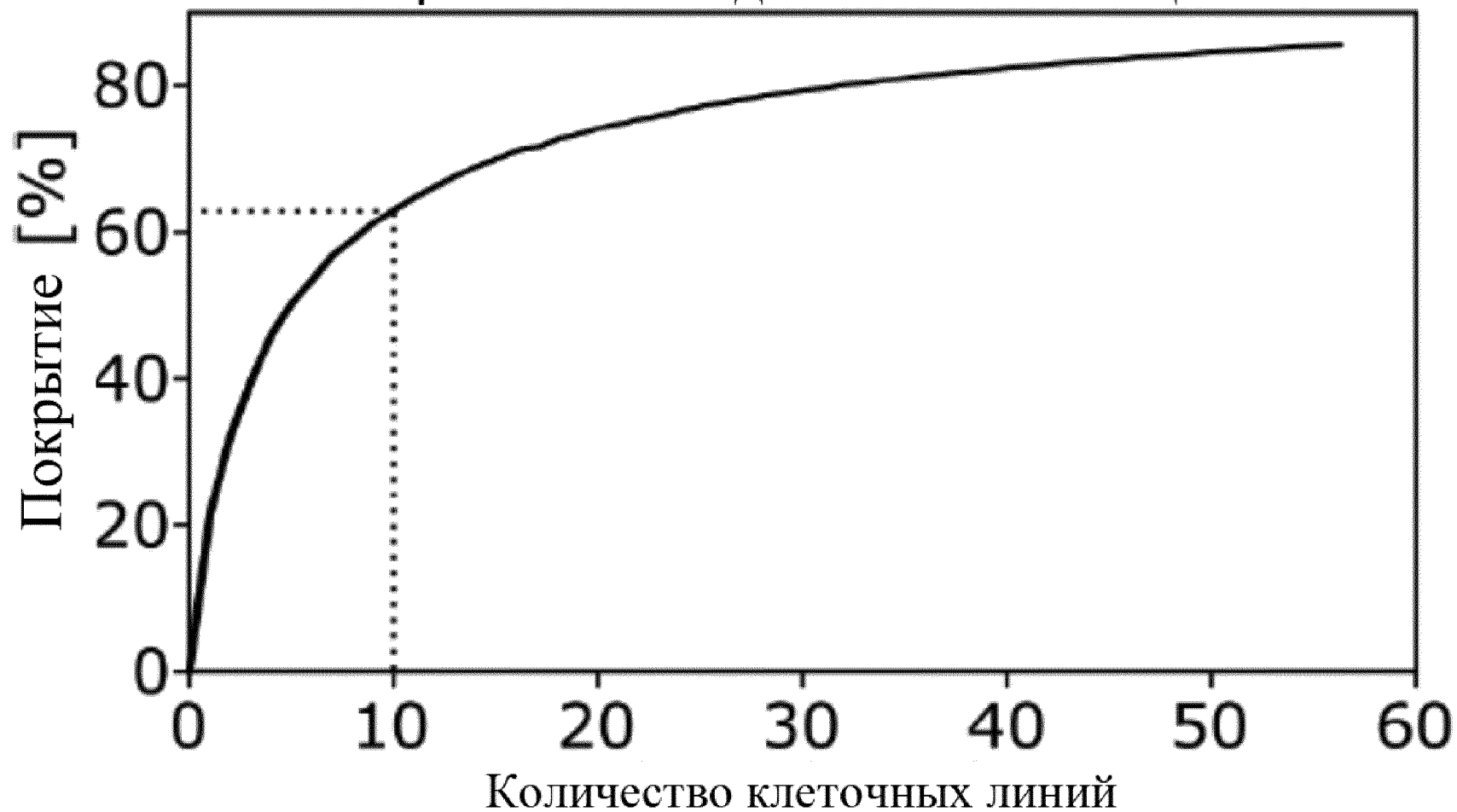


T98G
(PRAME-004 отрицательный)



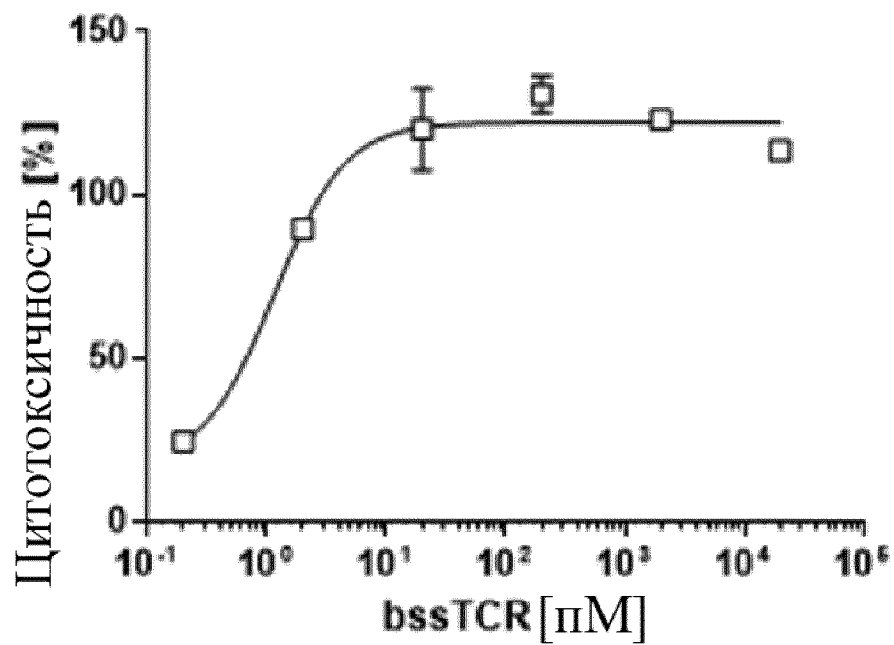
ФИГУРА 2

Покрытие пептидома согласно оценкам

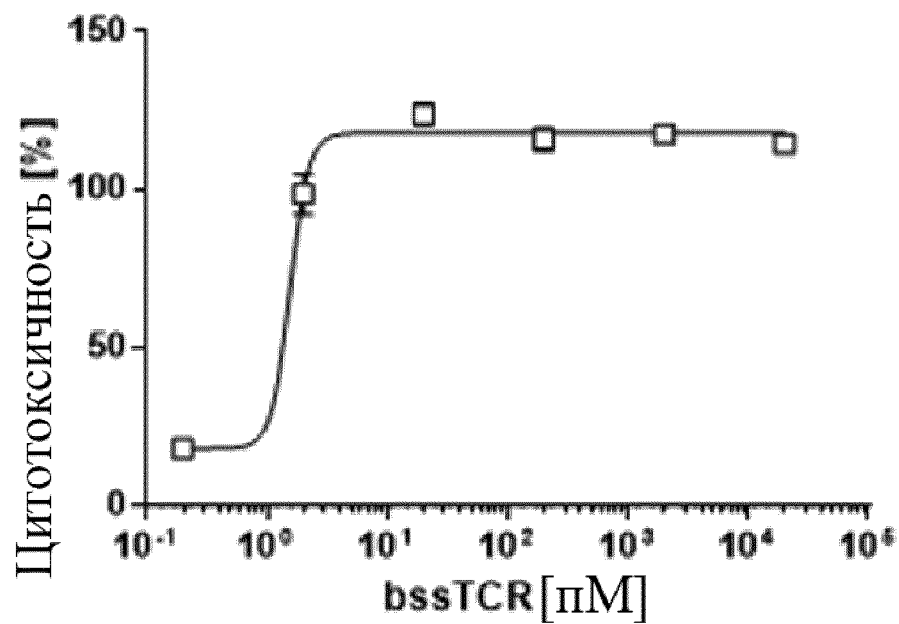


ФИГУРА 3

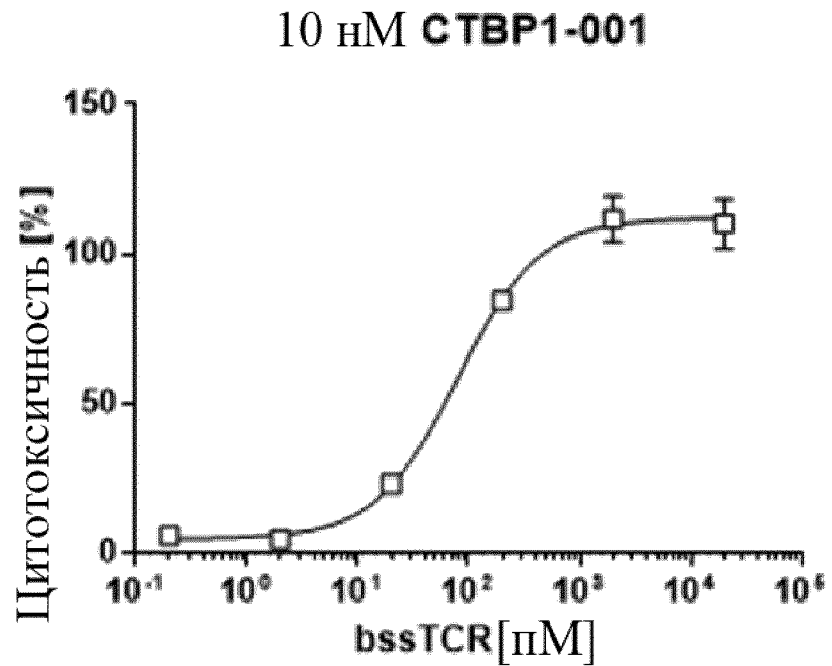
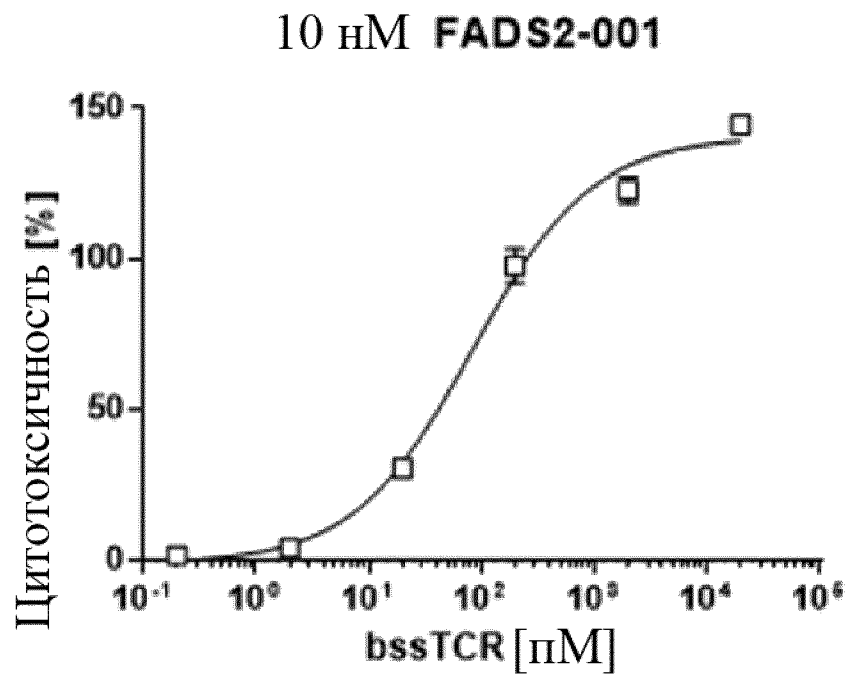
10 нМ PRAME-004



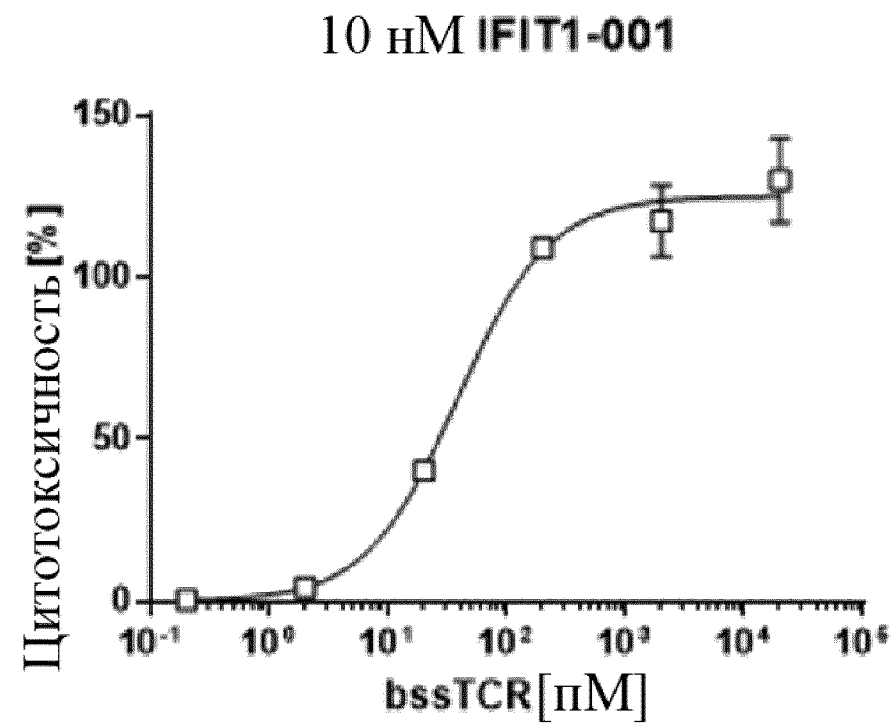
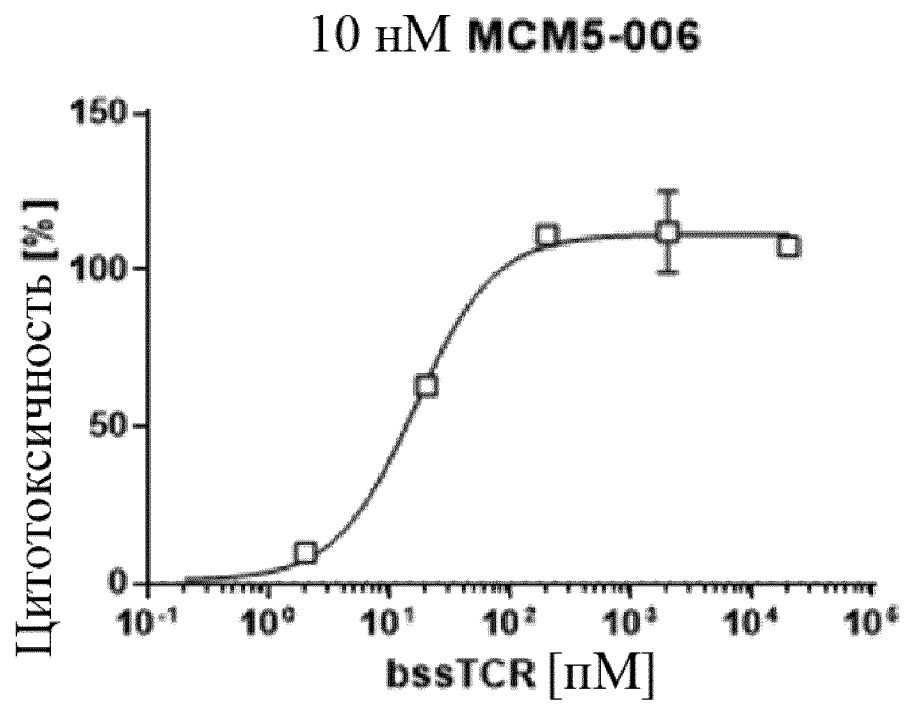
10 нМ IFT17-003



ФИГУРА 4

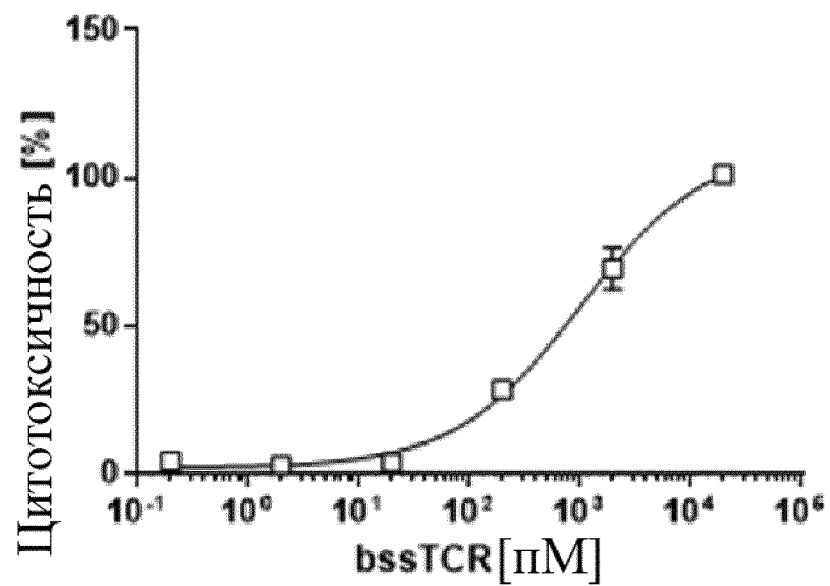


ФИГУРА 4 (продолжение)

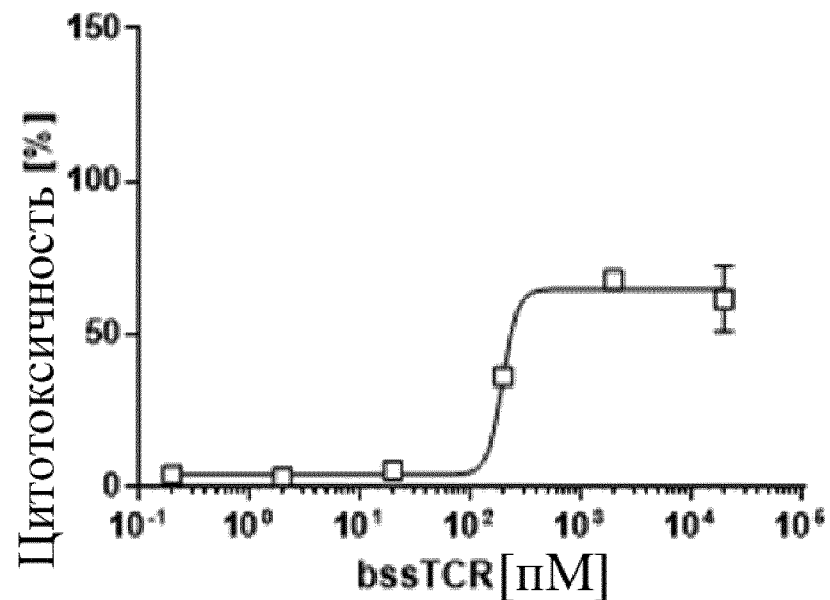


ФИГУРА 4 (продолжение)

10 нМ ITSН1-001

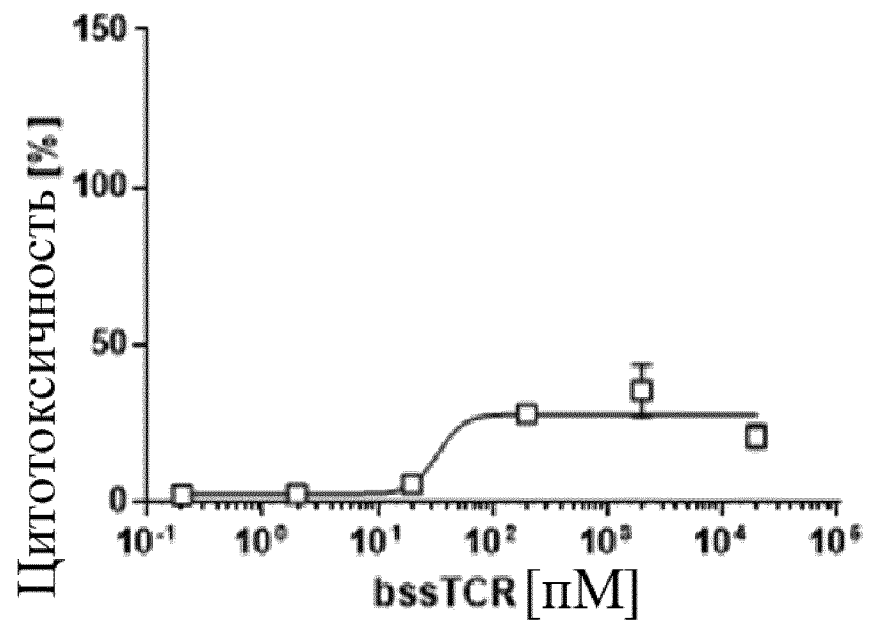


10 нМ АТР1А1-001

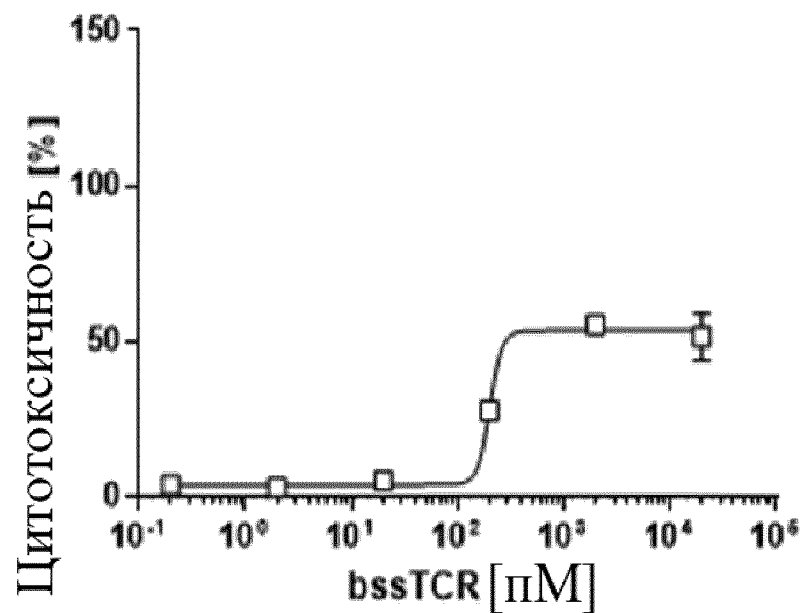


ФИГУРА 4 (продолжение)

10 нМ MCMB-002

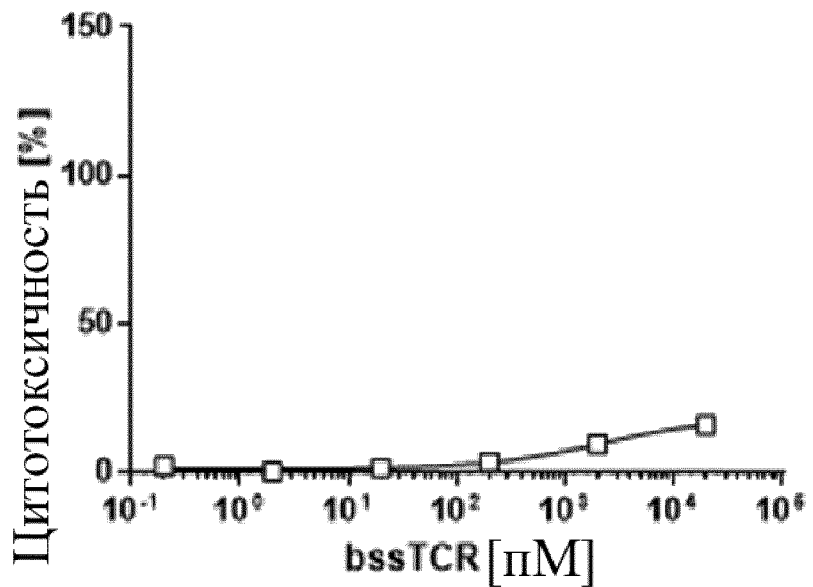


10 нМ NADK-002

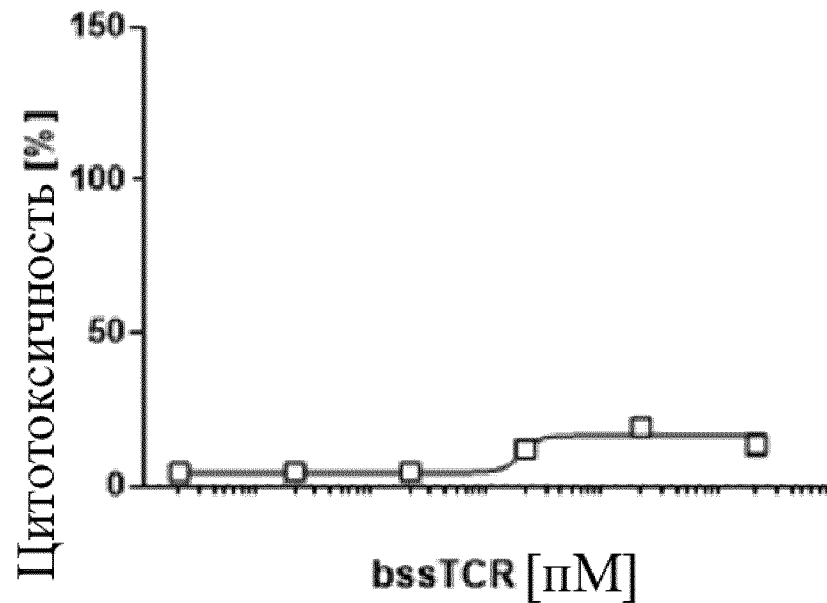


ФИГУРА 4 (продолжение)

10 нМ SF3B3-005

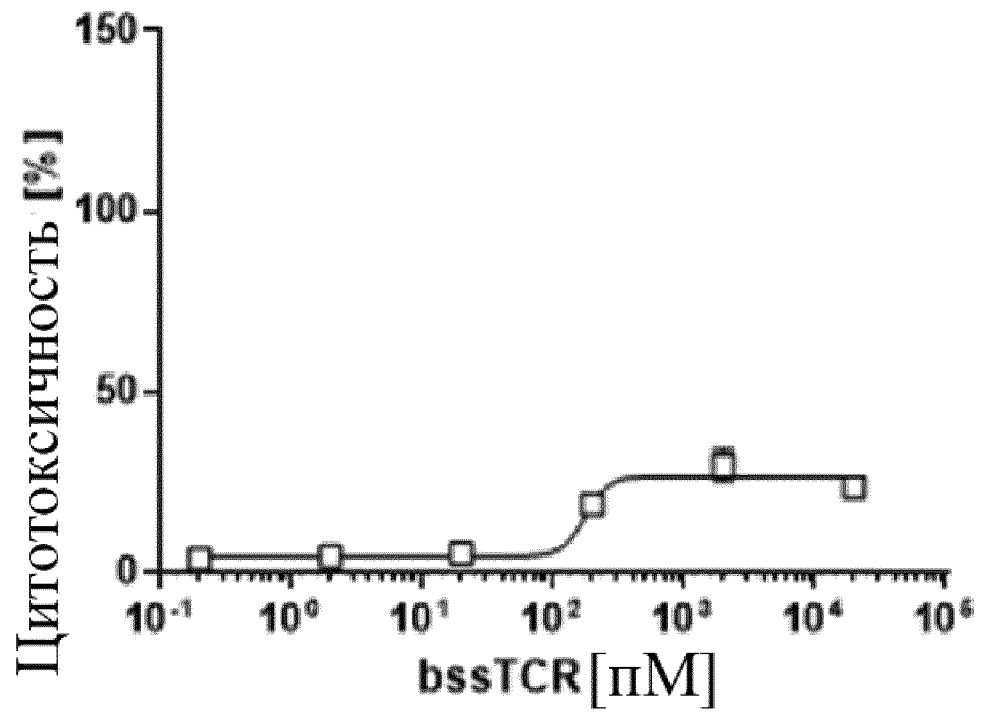


10 нМ EHD-001

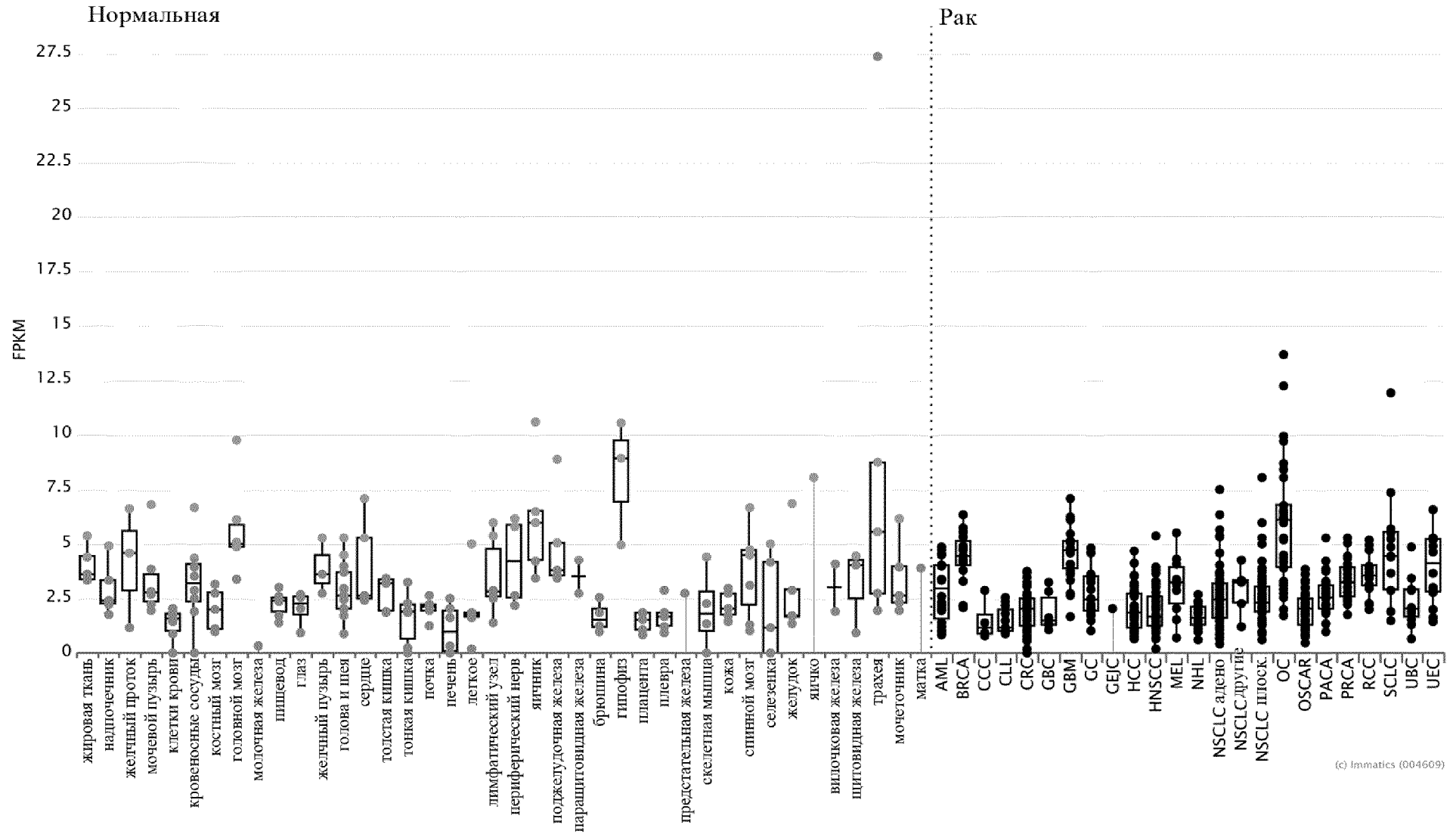


ФИГУРА 4 (продолжение)

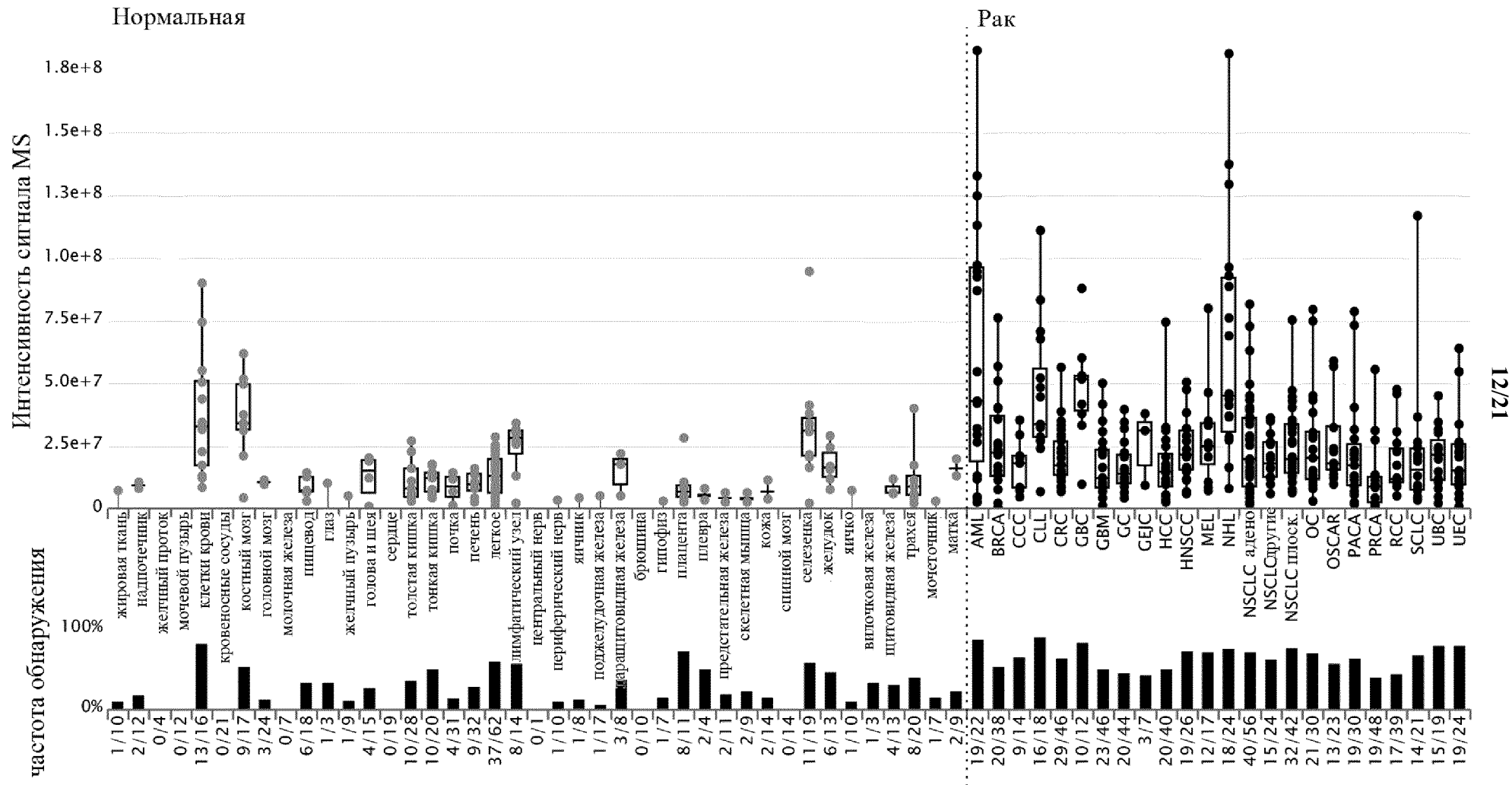
10 нМ EHD4-001



ФИГУРА 4 (продолжение)

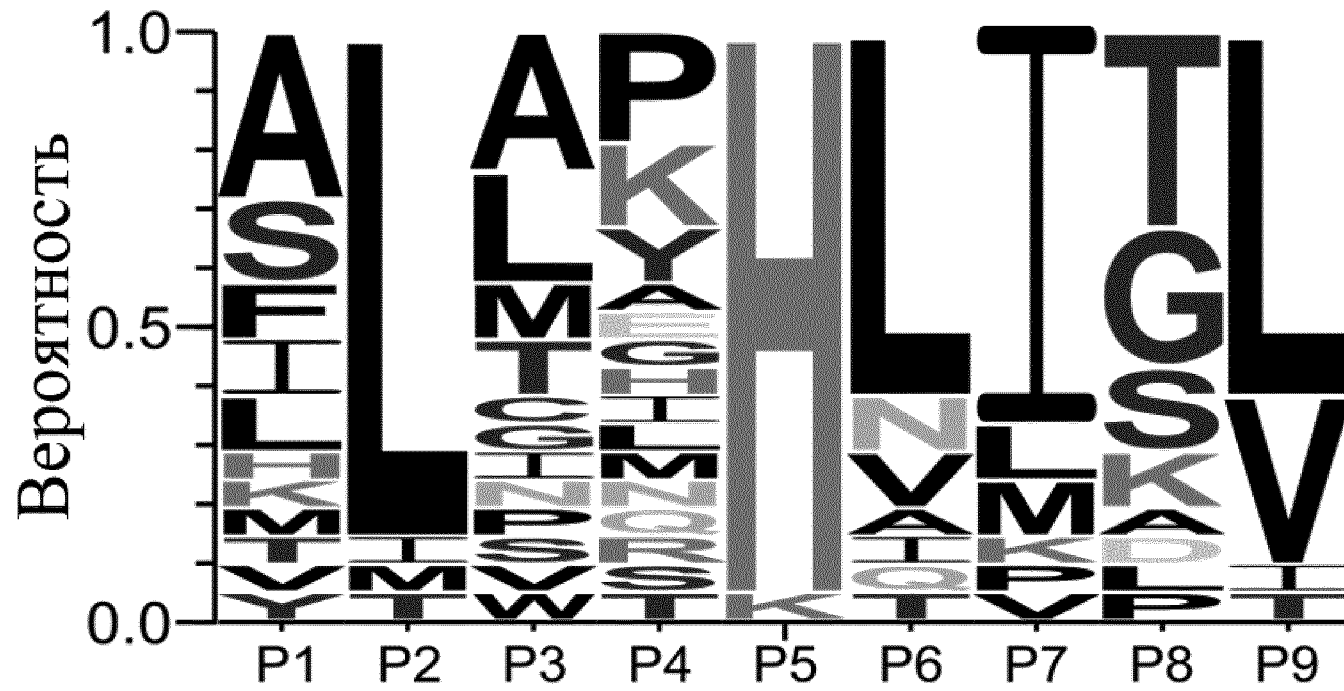


ФИГУРА 5



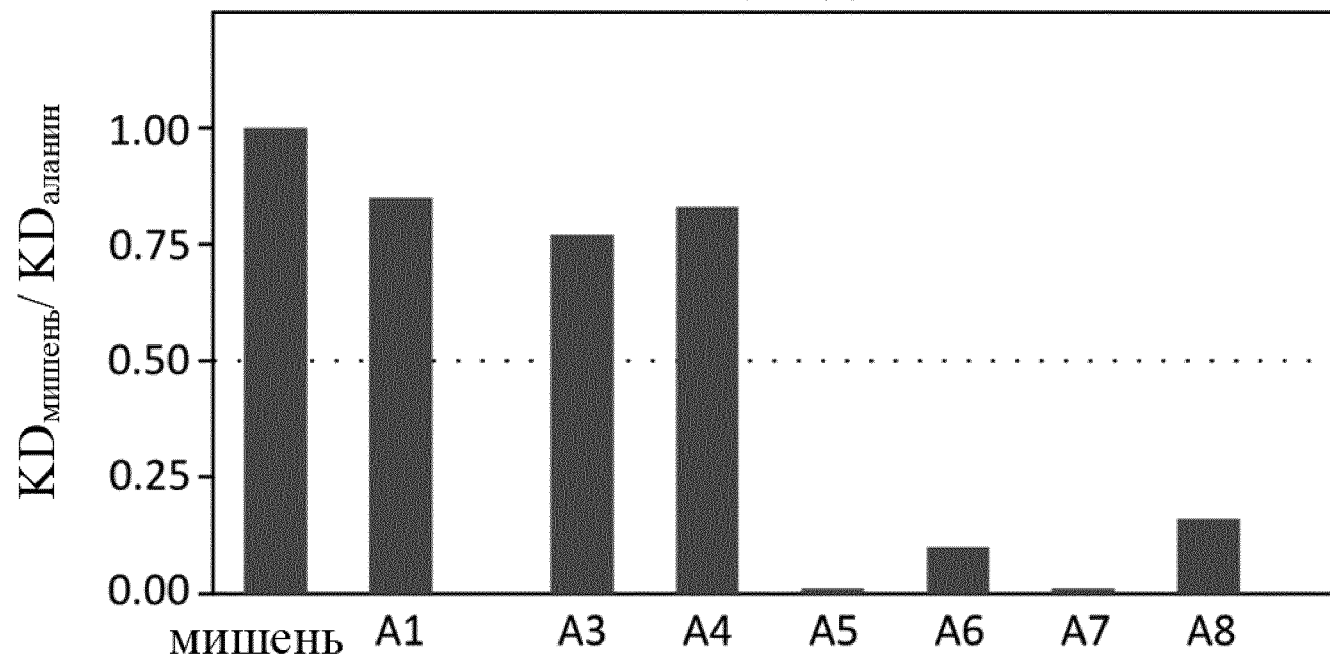
12/21

ФИГУРА 6



ФИГУРА 7

Полученный аланиновым сканированием на
основе биослойной интерферометрии
связывающий домен



пептид	$KD_{\text{мишень}} / KD_{\text{аланин}}$
мишень	1
A1	0.85
A3	0.77
A4	0.83
A5	0.01
A6	0.1
A7	0.01
A8	0.16

ФИГУРА 8

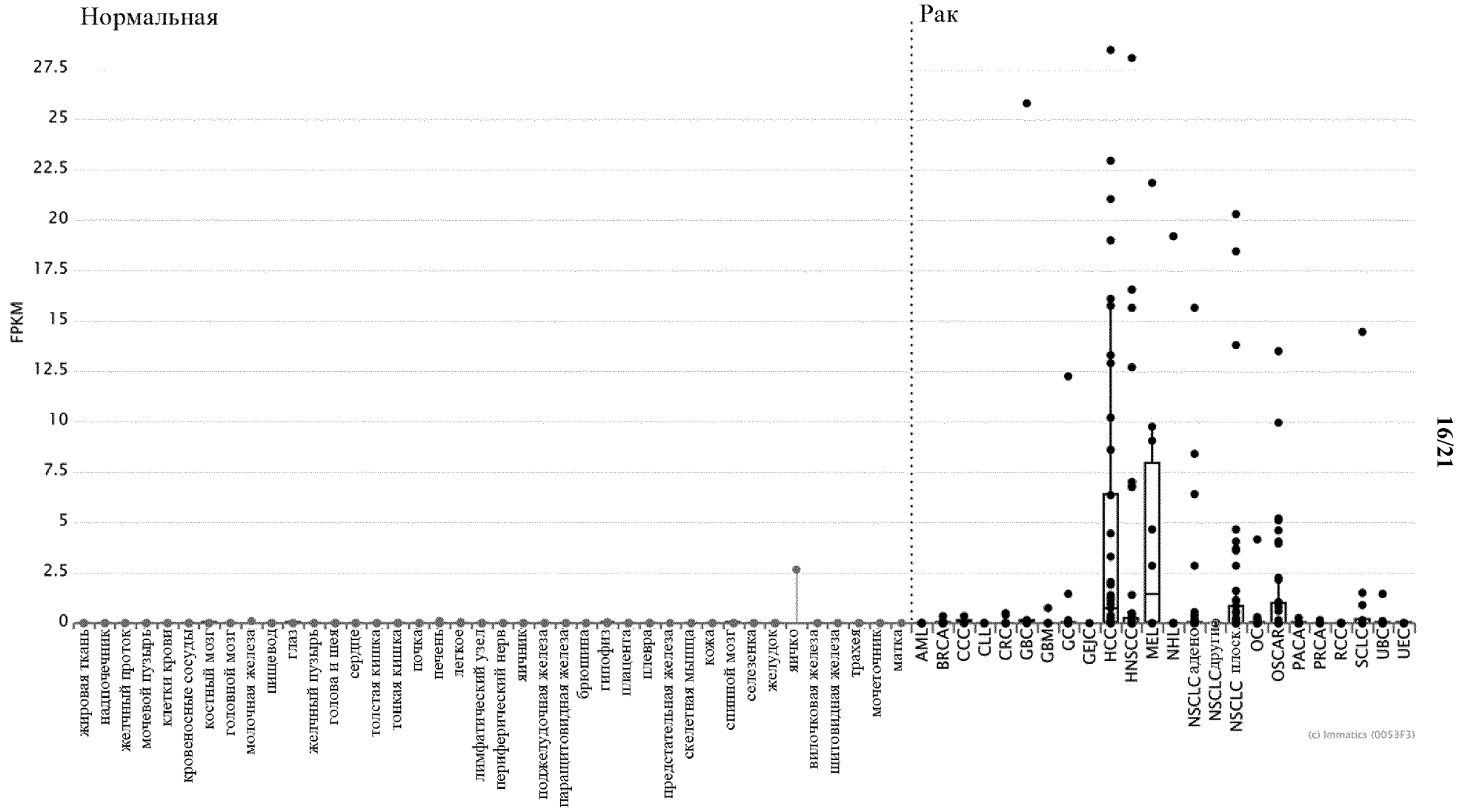
Замещенное положение в последовательности пептида

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	1.060	0.871	1.393	0.830	0.028	0.163	0.047	0.361	0.110
D	0.875	0.000	0.595	0.179	0.019	0.018	0.000	0.038	0.184
E	0.645	0.000	0.393	0.383	0.001	0.018	0.000	0.019	0.535
F	1.056	1.554	0.100	0.893	0.007	0.337	0.032	0.000	0.936
G	1.418	0.763	1.572	0.744	0.009	0.207	0.005	1.000	0.096
H	1.152	0.000	0.038	0.673	1.000	0.307	0.023	0.015	0.692
I	1.013	0.691	0.637	0.889	0.002	0.745	1.000	0.072	0.527
K	0.924	0.000	0.605	1.039	0.008	0.015	0.016	0.013	0.997
L	1.157	1.000	1.000	0.950	0.003	1.000	0.209	0.029	1.000
M	1.155	0.852	0.990	1.093	0.005	0.547	0.342	0.037	0.941
N	0.711	0.000	0.966	0.820	0.011	0.209	0.002	0.026	0.140
P	1.025	0.000	0.348	1.089	0.011	0.000	0.005	0.136	0.986
Q	0.718	0.868	0.861	1.000	0.014	0.349	0.004	0.054	0.743
R	1.117	0.000	0.009	1.186	0.001	0.193	0.000	0.197	0.159
S	1.000	1.382	1.146	0.829	0.015	0.155	0.014	0.555	0.122
T	0.686	0.871	0.948	0.794	0.001	0.149	0.037	0.565	0.536
V	1.001	0.824	0.627	0.974	0.004	0.367	0.226	0.047	0.511
W	0.883	0.000	0.805	0.518	0.003	0.212	0.000	0.000	0.285
Y	1.114	0.725	0.045	0.873	0.010	0.450	0.006	0.004	0.800

Замещенная аминокислота

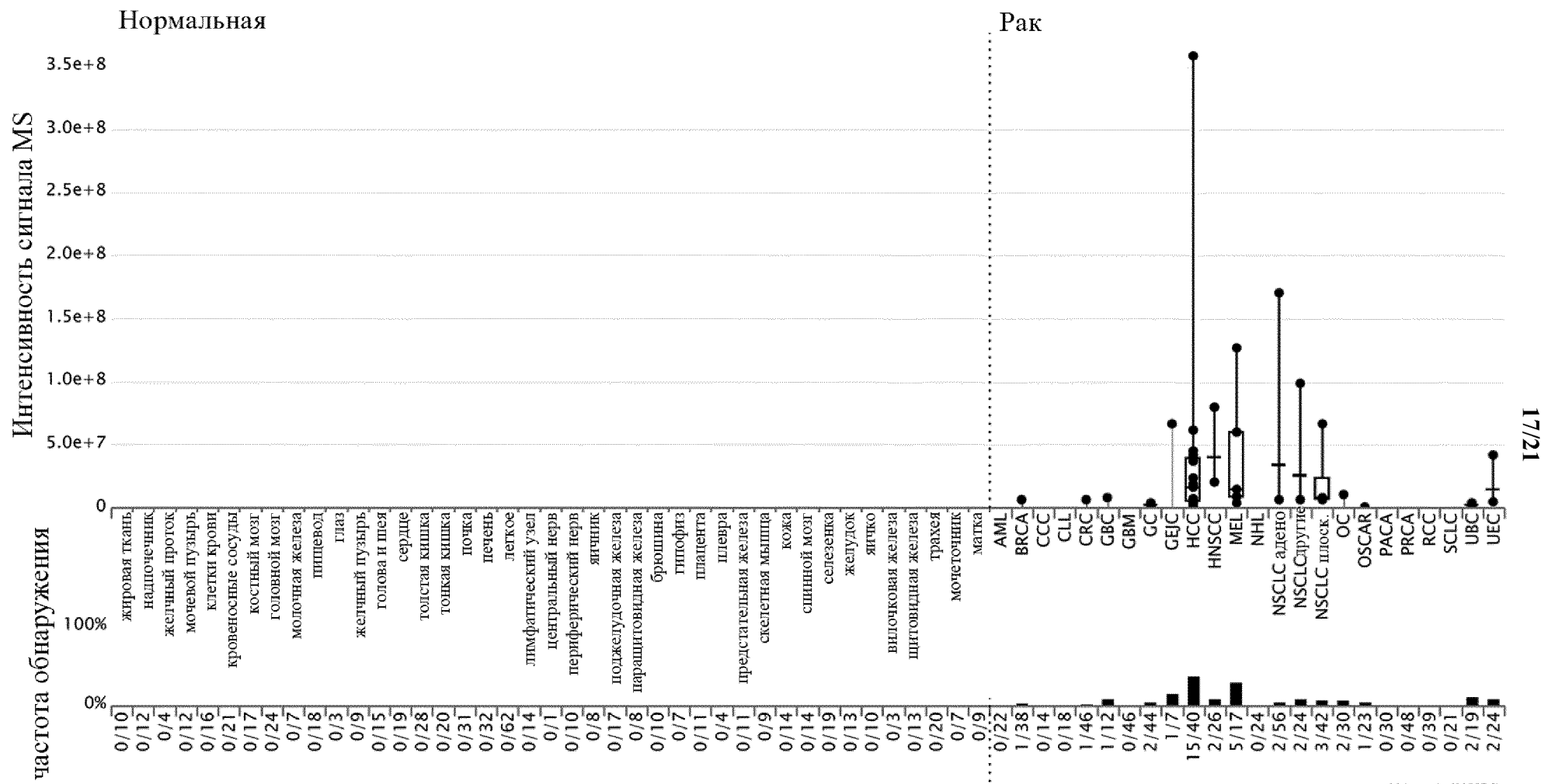
15/21

ФИГУРА 9



16/21

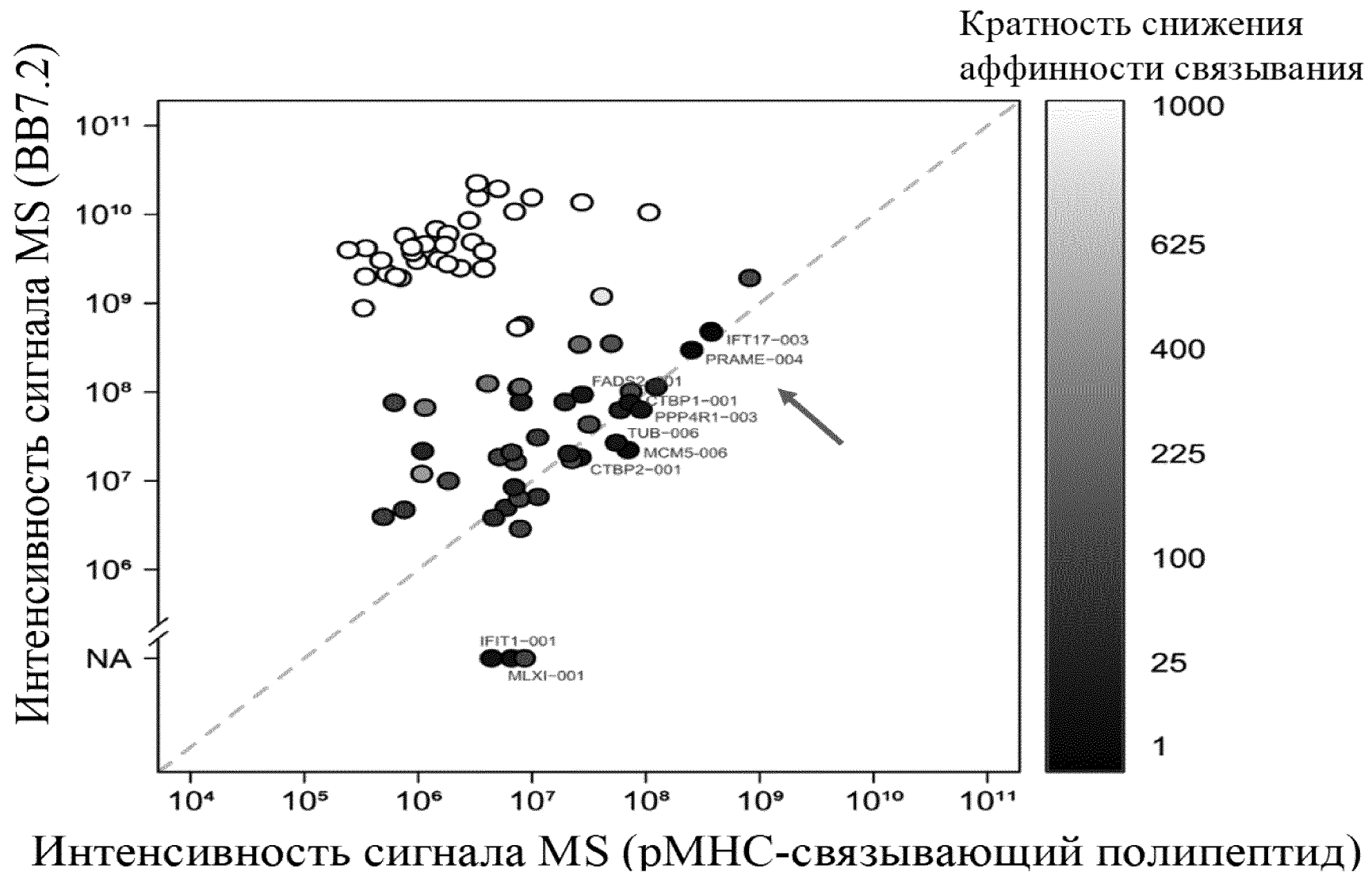
ФИГУРА 10



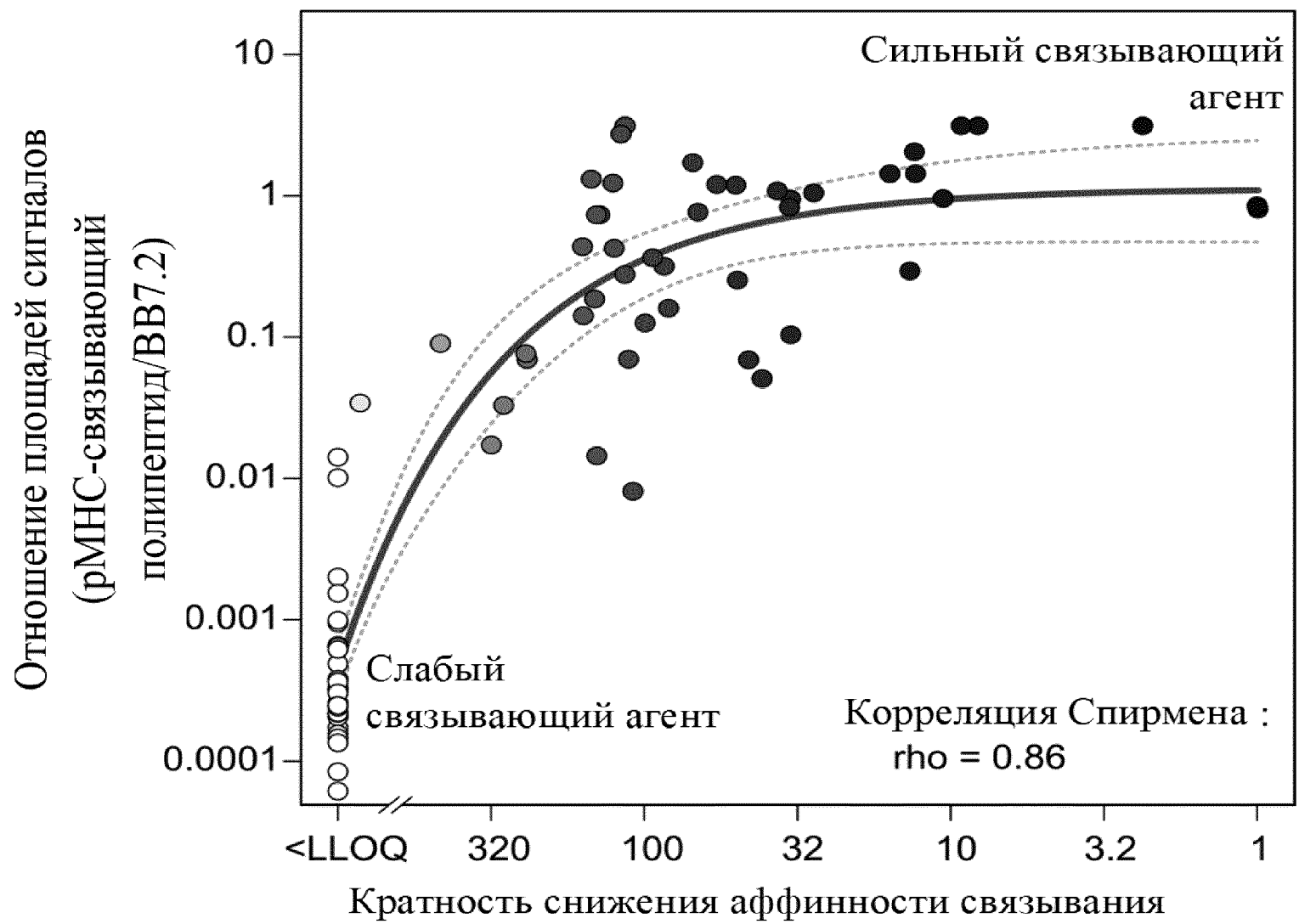
17/21

(c) Immatix(0060DC)

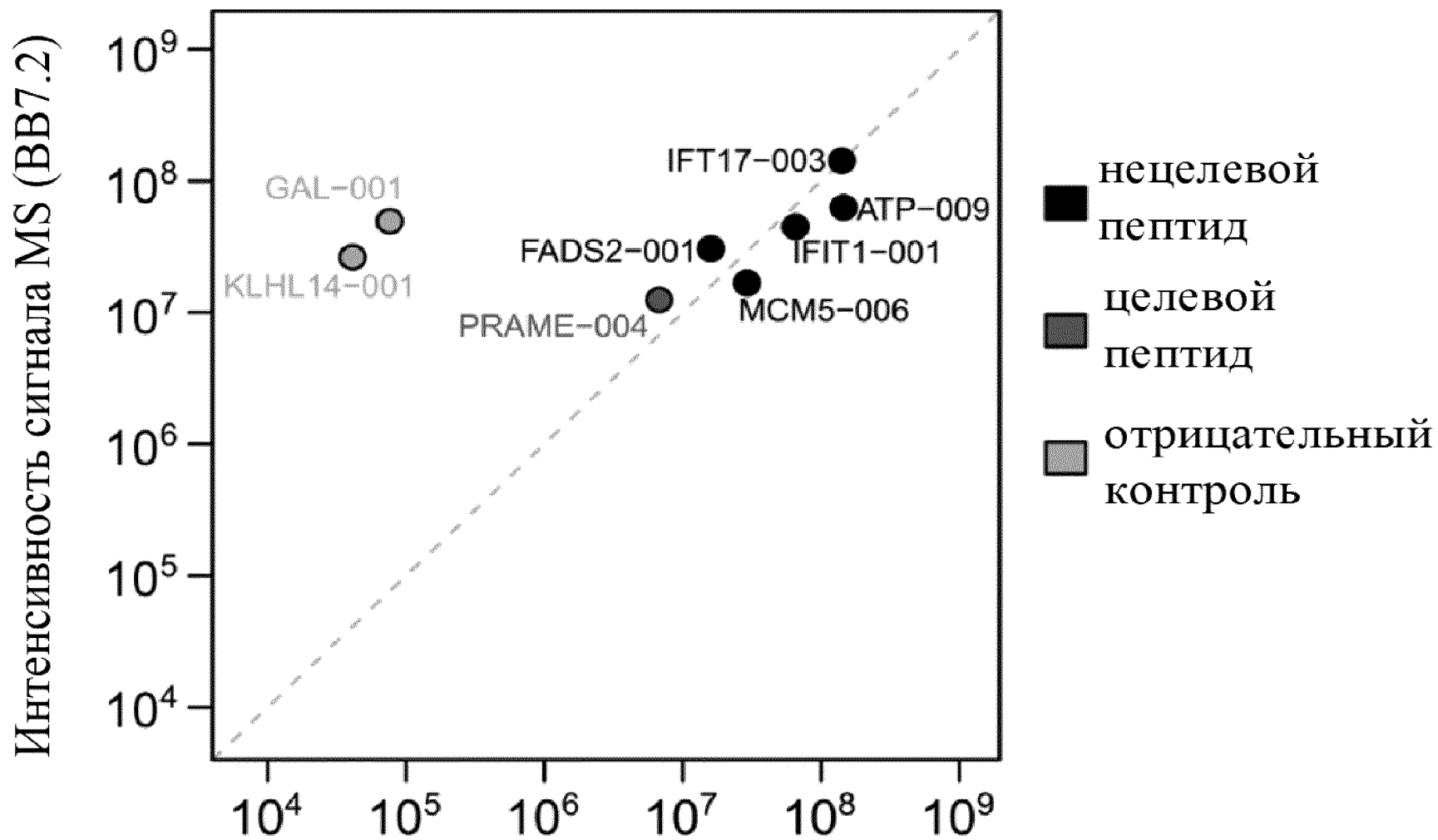
ФИГУРА 11



ФИГУРА 12



ФИГУРА 13



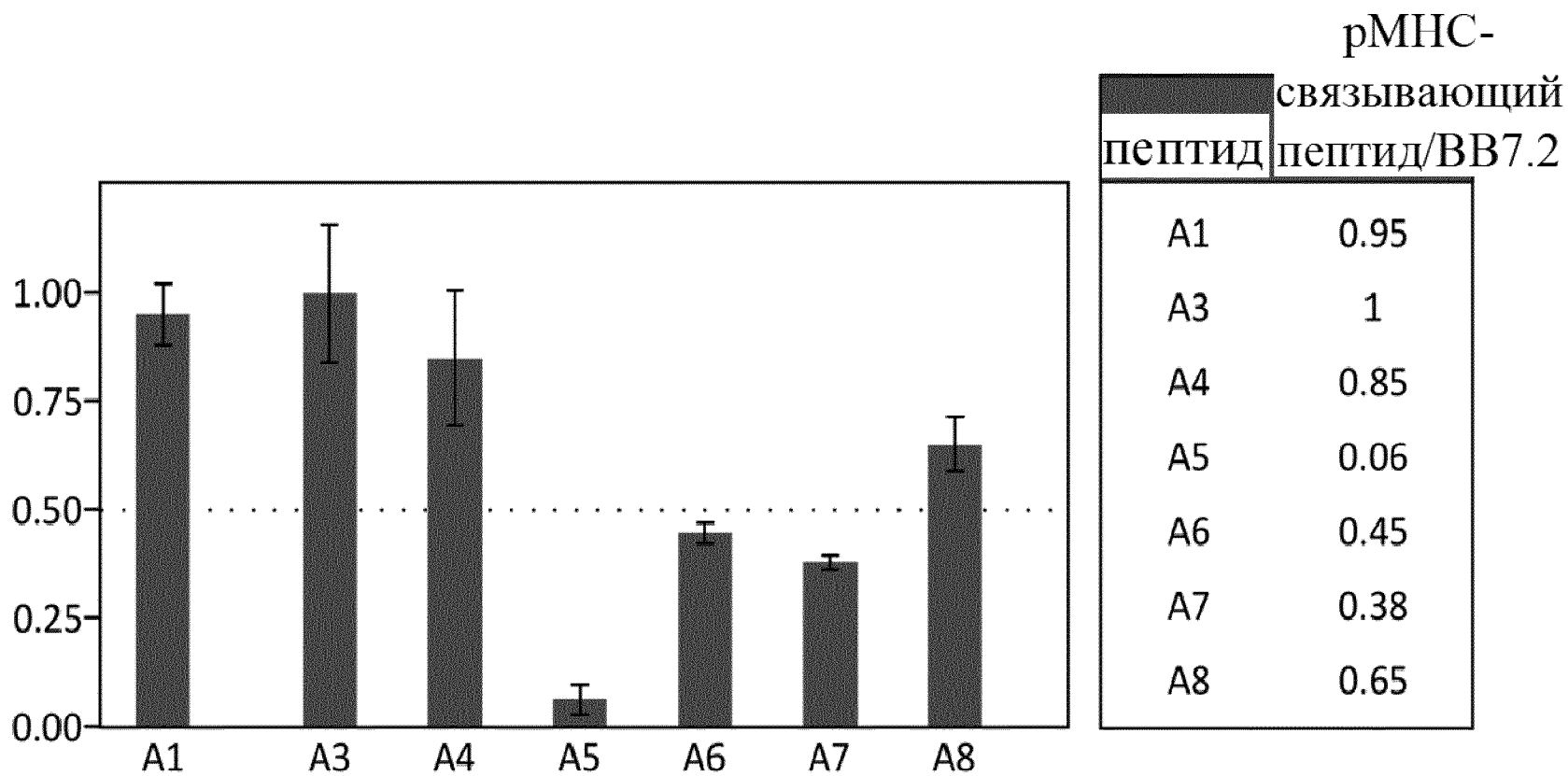
Интенсивность сигнала MS (BB7.2)

Интенсивность сигнала MS (pMHC-связывающий полипептид)

ФИГУРА 14

Полученный сканированием аланином связывающий мотив с использованием представленного способа

Нормализованное отношение площадей сигналов [рМНС-связывающий пептид/BB7.2]



ФИГУРА 15