


 ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2009129531/10, 26.12.2007

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
26.12.2007

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

03.01.2007 US 60/878,615

22.03.2007 US 60/896,472

(43) Дата публикации заявки: 10.02.2011 Бюл. № 4

(45) Опубликовано: 27.01.2013 Бюл. № 3

 (56) Список документов, цитированных в отчете о
 поиске: NAIR S. et al., Vaccination against the
 Forkhead Family Transcription Factor Foxp3.
 Enhances Tumor Immunity, Cancer Res, 2007,
 n.67 (1), January 1, 2007. WO 2004024766 A1,
 25.03.2004. US 2003170648, 11.09.2003. RU
 2129439, 27.04.1999.
(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 03.08.2009(86) Заявка РСТ:
JP 2007/001466 (26.12.2007)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2008/081581 (10.07.2008)

Адрес для переписки:

 129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
 ООО "Юридическая фирма Городисский и
 Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег.№ 517

(72) Автор(ы):

ЦУНОДА Такуя (JP),

ОСАВА Рюдзи (JP)

(73) Патентообладатель(и):

ОНКОТЕРАПИ САЙЕНС, ИНК. (JP)

(54) ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ ПЕПТИДА FOXR3

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии. Представлен пептид, обладающий способностью индуцировать цитотоксические Т-клетки, где пептид состоит из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:3-5, 7-9, 12, 15-19, 22, 24, 27-30, 37, 67 или 74, а также представлен пептид, обладающий способностью индуцировать цитотоксические Т-клетки, где пептид состоит из

аминокислотной последовательности SEQ ID NO:3-5, 7-9, 12, 17, 67 или 74, в которой заменены или добавлены 1 или 2 аминокислоты. Представлен пептид, обладающий способностью индуцировать цитотоксические Т-клетки, где пептид состоит из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:15-19, 22, 24, 27-30 и 37, в которой заменены или добавлены 1 или 2 аминокислоты. Представлено

фармацевтическое средство, использующееся для регуляции клеток T-reg, содержащее 1 или несколько типов заявленных пептидов. Раскрыт способ индукции антиген-презентирующих клеток. Представлены выделенная цитотоксическая клетка и антиген-презентирующая клетка. Раскрыт способ регуляции клеток T-reg, а также раскрыто

применение указанных пептидов для получения вакцины. Представлены полинуклеотиды, кодирующие заявленные пептиды. Изобретение позволяет получить пептиды, использующиеся в составе фармацевтического средства, предназначенного для регуляции T-reg клеток. 12 н. и 9 з.п. ф-лы, 10 ил., 4 табл., 1 пр.

RU 2 4 7 3 5 5 7 C 2

RU 2 4 7 3 5 5 7 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2009129531/10, 26.12.2007**

(24) Effective date for property rights:
26.12.2007

Priority:

(30) Convention priority:
03.01.2007 US 60/878,615
22.03.2007 US 60/896,472

(43) Application published: **10.02.2011 Bull. 4**

(45) Date of publication: **27.01.2013 Bull. 3**

(85) Commencement of national phase: **03.08.2009**

(86) PCT application:
JP 2007/001466 (26.12.2007)

(87) PCT publication:
WO 2008/081581 (10.07.2008)

Mail address:

129090, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. E.E.Nazinoj, reg.№ 517

(72) Inventor(s):

TsUNODA Takuja (JP),
OSAVA Rjudzi (JP)

(73) Proprietor(s):

ONKOTERAPI SAJENS, INK. (JP)

(54) FOXP3 PEPTIDE VACCINE

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention refers to biochemistry. What is presented is a peptide having an ability to induce cytotoxic T-cells wherein the peptide consists of amino acid sequences SEQ ID NO:3-5, 7-9, 12, 15-19, 22, 24, 27-30, 37, 67 or 74, what is also presented is a peptide having an ability to induce cytotoxic T-cells wherein the peptide consists of amino acid sequences SEQ ID NO:3-5, 7-9, 12, 17, 67 or 74 wherein 1 or 2 amino acids are substituted or added. What is presented is a peptide having an ability to induce cytotoxic T-cells wherein the peptide consists of amino acid sequences SEQ ID NO:15-19, 22, 24, 27-30 and 37 wherein 1 or 2 amino

acids are substituted or added. What is presented is a pharmaceutical agent used for regulation of T-reg cells containing 1 or more types of said peptides. What is disclosed is a method for inducing antigen-presenting cells. What is presented is a recovered cytotoxic cell and an antigen-presenting cell. What is disclosed is a method for regulation of T-reg cells; what is also disclosed is the used of said peptides for producing a vaccine. There are presented polynucleotides coding said peptides.

EFFECT: invention enables producing the peptides used in the pharmaceutical agent for regulation of T-reg cells.

21 cl, 10 dwg, 4 tbl, 1 ex

Область техники, к которой относится изобретение

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США 60/878615, поданной 3 января 2007, и предварительной заявки США 60/896472, поданной 22 марта 2007, содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки.

Настоящее изобретение относится к области биологии, более конкретно к терапии рака. Конкретно, настоящее изобретение относится к пептидам Foxp3, которые необычайно эффективны в качестве противораковых вакцин, и к лекарственным средствам для лечения и профилактики опухолей.

Предшествующий уровень техники

Было показано, что CD8+ цитотоксические Т-лимфоциты (CTL) распознают пептидные эпитопы, выделенные из связанных с опухолями антигенов (ТАА), присутствующих на молекуле МНС класса I, и затем уничтожают опухолевые клетки. С момента обнаружения MAGE-семейства, первого примера антигенов ТАА, было обнаружено много других антигенов ТАА с использованием иммунологических способов (Boon T, Int J Cancer 54: 177-80, 1993; Boon T et al., J Exp Med 183: 725-9, 1996; van der Bruggen P et al., Science 254: 1643-7, 1991; Brichard V et al., J Exp Med 178: 489-95, 1993; Kawakami Y et al., J Exp Med 180: 347-52, 1994), и некоторые из них находятся в настоящее время в процессе клинического исследования в качестве мишеней иммунотерапии.

Идентификация новых антигенов ТАА, которые индуцируют сильный и специфичный противоопухолевый иммунный ответ, стала основанием для дальнейшей разработки клинического применения стратегий пептидной вакцинации для различных типов рака (Harris CC, J Natl Cancer Inst 88: 1442-5, 1996; Butterfield LH et al., Cancer Res 59: 3134-42, 1999; Vissers JLM et al., Cancer Res 59: 5554-9, 1999; Van der Burg SH et al., J Immunol 156: 3308-14, 1996; Tanaka F et al., Cancer Res 57: 4465-8, 1997; Fujie T et al., Int J Cancer 80: 169-72, 1999; Kikuchi M et al., Int J Cancer 81: 459-66, 1999; Oiso M et al., Int J Cancer 81: 387-94, 1999).

Были выполнены различные типы антиген-специфичной иммунотерапии, однако до сих пор получали низкую клиническую эффективность из-за очевидной опухолевой регрессии (Rosenberg SA et al., Nat Med 10:909-15, 2004). Одной из главных причин является слабый иммунный ответ противоопухолевых эффекторных лимфоцитов (TIL) и лимфоцитов периферической крови (PBL) у пациентов с поздней стадией рака (Miescher S et al., J Immunol 136: 1899-907, 1986). Такая иммуносупрессия, индуцированная опухолью, является причиной слабого ответа на опухолевые антигены (Young RC et al., Am J Med 52: 63-8, 1972), слабой пролиферации Т-клеток (Alexander JP et al., Cancer Res 53: 1380-7, 1993), причиной ослабления продукции цитокинов (Horiguchi S et al., Cancer Res 59: 2950-6, 1999) и дефектной сигнальной трансдукции Т-клеток и природных клеток-киллеров (Kono K et al., Clin Cancer Res 11: 1825-8, 1996; Kiessling R et al., Cancer Immunol Immunother 48: 353-62, 1999).

Для улучшения клинической эффективности иммунотерапии важным является преодоление эффекта иммуносупрессивных факторов, индуцированных опухолями. Иммунологическую толерантность и защиту от аутоиммунитета обеспечивают центральный и периферический механизмы, включая клональную делецию самоактивирующихся Т-клеток в тимусе и индукцию анэргии при встрече с аутоантигенами на периферии. Недавно стало ясно, что регуляторные Т-клетки (T-reg), характеризующиеся ко-экспрессией маркеров CD4 и CD25, представляют собой

функционально уникальную популяцию Т-клеток и функционируют для поддержания иммунного гомеостаза (Sakaguchi S et al., J Immunol. 155: 1151-64, 1995, Dieckmann D et al., J Exp Med 193: 1303-10, 2001). Клетки Т-reg являются одним из главных участников подавления различных типов иммунного ответа (Miescher S et al., J Immunol 136: 1899-907, 1986; Young RC et al., Am J Med 52: 63-72, 1972; Alexander JP et al., Cancer Res 53: 1380-7, 1997; Horiguchi S et al., Cancer Res 59: 2950-6, 1999; Kono K et al., Clin Cancer Res 11: 1825-8, 1996; Kiessling R et al., Cancer Immunol Immunother 48: 353-62, 1999).

Хотя молекулярные взаимодействия и сигнальные пути, которые являются важными для создания и функционирования клеток Т-reg, еще до конца не ясны, клетки Т-reg требуют наличия транскрипционного фактора скурфин (scurfin) семейства Forkhead (Foxp3; SEQ ID NO:2), кодируемого геном Foxp3 (GenBank Accession No. NM_014009; SEQ ID NO:1), который контролирует их развитие и регуляторные свойства (Fontenot JD et al., Nat Immunol 4: 330-6, 2003, Hori S et al., Science 299: 1057-61, 2003, Khattri R et al., Nat Immunol 4: 304-6, 2003). Кроме того, вакцинация мышей дендритными клетками, трансфецированными мРНК Foxp3, вызывает Foxp3-специфичный ответ клеток CTL (Smita N et al., Cancer Res. Jan 1; 67(1):371-80, 2007).

Таким образом, Foxp3 служит мишенью для противораковой иммунотерапии и, более того, неполные пептиды белка, кодируемого геном Foxp3, служат в качестве антигенов, распознаваемых клетками CTL.

Сущность изобретения

Для повышения клинической эффективности иммунотерапии важно подавить иммуносупрессивные факторы, индуцированные опухолью. Было обнаружено, что клетка Т-reg является одним из главных участников подавления различных типов иммунного ответа. Таким образом, необходимо разработать вакцины, направленные на клетки Т-reg, экспрессирующие Foxp3, чтобы подавить Т-reg-индуцированную иммуносупрессию.

Настоящее изобретение основано, по крайней мере отчасти, на идентификации пептидов эпитопа генного продукта Foxp3, которые вызывают ответ цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), специфичных к соответствующим пептидам Foxp3 или эпитопам. Мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) здорового донора стимулировали, используя HLA-A*24- и HLA-A*02-связывающие кандидатные пептиды Foxp3. Было показано, что эти пептиды являются пептидами с эпитопами, ограниченными HLA-A24- или HLA-A02, которые могут индуцировать эффективный и специфичный иммунный ответ в отношении клеток Т-reg, экспрессирующих Foxp3.

Соответственно, настоящее изобретение относится к способам регуляции иммуносупрессии, включающим стадию введения полипептидов Foxp3 по изобретению. Антииммуносупрессия (т.е. реверсия или противодействие иммуносупрессии), например, цитотоксических Т-лимфоцитов индуцируется с помощью введения полипептидов Foxp3. Таким образом, настоящее изобретение относится к способам индукции антииммуносупрессии, включающим стадию введения полипептидов Foxp3, а также к фармацевтическим средствам для регуляции иммуносупрессии, включающим полипептиды Foxp3.

В одном аспекте изобретение относится к пептидам, содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO:3-5, 7-9, 12, 15-19, 22, 24, 27-30, 37, 67 или 74.

В другом аспекте изобретение относится к пептидам, обладающим способностью индуцировать цитотоксические Т-клетки, содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности, выбранной из группы:

(a) SEQ ID NO:3-5, 7-9, 12, 17, 67 или 74; и

(b) SEQ ID NO:3-5, 7-9, 12, 17, 67 или 74, в которых заменены или введены 1, 2 или несколько аминокислот.

В следующем аспекте изобретение относится к пептидам, обладающим способностью индуцировать цитотоксические Т-клетки, содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности, выбранной из группы:

(a) SEQ ID NO:15-19, 22, 24, 27-30 или 37, и

(b) SEQ ID NO:15-19, 22, 24, 27-30 или 37, в которых заменены или введены 1, 2 или несколько аминокислот.

Что касается вариантов осуществления, в некоторых вариантах осуществления второй аминокислотой с N-конца является фенилаланин, тирозин, метионин или триптофан. В некоторых вариантах осуществления C-концевой аминокислотой является фенилаланин, лейцин, изолейцин, триптофан или метионин. В некоторых вариантах осуществления второй аминокислотой с N-конца является лейцин или метионин. В некоторых вариантах осуществления C-концевой аминокислотой является валин или лейцин. Например, пептид, содержащий замены, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:95, 97 или 98.

Изобретение дополнительно относится к композициям, содержащим пептиды Foxp3 по изобретению или полинуклеотиды, кодирующие пептиды Foxp3 по изобретению, и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. В некоторых вариантах осуществления композиции приготовлены для введения в виде вакцины.

Композиции могут содержать один пептид или множество различных пептидов Foxp3 по изобретению. Композиции могут применяться для ингибирования клеток Т-reg, например для ингибирования пролиферации или подавления функции клетки Т-reg.

В некоторых вариантах осуществления композиции содержат один или несколько пептидов Foxp3, которые вызывают иммунный ответ, который ингибирует клетки Т-reg у индивида, антиген HLA которого представляет собой HLA-A24. В некоторых вариантах осуществления композиции содержат один или несколько пептидов Foxp3, которые вызывают иммунный ответ, который ингибирует клетки Т-reg у индивида, антиген HLA которого представляет собой HLA-A02.

В другом аспекте изобретение относится к композициям, содержащим полинуклеотид, кодирующий пептид Foxp3 по изобретению. В некоторых вариантах осуществления композиции содержат множество (т.е. два или несколько) полинуклеотидов, кодирующих множество пептидов Foxp3 по изобретению. В некоторых вариантах осуществления композиции содержат полинуклеотид, который кодирует множество пептидов Foxp3 по изобретению.

В некоторых вариантах осуществления композиции содержат другой пептид, который обладает способностью индуцировать цитотоксические Т-клетки против раковых клеток, или содержат другой полинуклеотид, кодирующий этот другой пептид.

В следующем аспекте изобретение относится к экзосоме, которая презентрует на своей поверхности комплекс, содержащий антиген HLA и пептид Foxp3 по изобретению. В некоторых вариантах осуществления антиген HLA выбран из группы, состоящей из антигенов HLA-A24, HLA-A2402, HLA-A02 и HLA-A0201.

В подобном аспекте изобретение относится к способам лечения рака (например, уменьшения роста опухолевых клеток, стимулирования смерти опухолевых клеток) путем введения индивиду пептида Foxp3 или полинуклеотида, кодирующего этот

пептид Foxp3.

В другом аспекте изобретение относится к способам индукции антиген-презентирующих клеток, обладающих высокой способностью индуцировать цитотоксические Т-клетки, путем введения пептида Foxp3 по изобретению или полинуклеотида, кодирующего этот пептид Foxp3.

В другом аспекте изобретение относится к способам индукции цитотоксических Т-клеток путем введения пептида Foxp3 по изобретению или полинуклеотида, кодирующего этот пептид Foxp3.

В подобном аспекте изобретение относится к выделенной цитотоксической Т-клетке, индуцируемой пептидом Foxp3 по изобретению.

В другом аспекте изобретение относится к антиген-презентирующей клетке, которая содержит комплекс, образованный антигеном HLA и пептидом Foxp3 по изобретению. В некоторых вариантах осуществления антиген-презентирующая клетка является выделенной.

В следующем аспекте изобретение относится к способам регуляции клеток T-reg у индивида, включающим введение индивиду вакцины, содержащей пептид Foxp3 по изобретению или иммунологически активный фрагмент пептида или полинуклеотид, кодирующий этот пептид.

При применении способов лечения индивидуумом или пациентом может являться человек.

Следует понимать, что и описанная выше сущность изобретения, и следующее подробное описание представляют собой конкретные варианты осуществления и не ограничивают изобретение или другие альтернативные варианты осуществления изобретения.

Краткое описание фигур

Фиг.1. На фиг.1 изображены фотографии, показывающие результаты анализа IFN- γ -ELISPOT на клетках CTL, которые индуцировали пептидами, полученными из Foxp3. На фиг.1А клетки CTL в лунках с номерами #2 и 7, стимулированные Foxp3-A24-9-363 (SEQ ID NO:3), #1 и #6, стимулированные Foxp3-A24-9-366 (SEQ ID NO:7), #5, стимулированные Foxp3-A24-9-190 (SEQ ID NO:9) и #7, стимулированные Foxp3-A24-10-87 (SEQ ID NO:67) и Foxp3-A24-10-60 (SEQ ID NO:74), продемонстрировали эффективное продуцирование IFN- γ по сравнению с контролем. На фиг.1В клетки CTL в лунке под номером #4, стимулированные Foxp3-A24-9-207 (SEQ ID NO:4), #6, стимулированные Foxp3-A24-9-332 (SEQ ID NO:5), #6, стимулированные Foxp3-A24-9-337 (SEQ ID NO:8), и #1, стимулированные Foxp3-A24-10-114 (SEQ ID NO:12), продемонстрировали эффективное продуцирование IFN- γ по сравнению с контролем.

Фиг.2А-В. На фиг.2 изображены фотографии, показывающие результаты анализа IFN- γ -ELISPOT на клетках CTL, которые индуцировали пептидами, полученных из Foxp3. На фиг.2А, клетки CTL в лунке под номером #2, стимулированные Foxp3-A2-9-390 (SEQ ID NO:15), #2, стимулированные Foxp3-A2-9-69 (SEQ ID NO:16), #6, стимулированные Foxp3-A2-9-252 (SEQ ID NO:17), #4, стимулированные Foxp3-A2-10-359 (SEQ ID NO:22), #7, стимулированные Foxp3-A2-263 (SEQ ID NO:24), и #2 и #5, стимулированные Foxp3-A2-10-94 (SEQ ID NO:27), продемонстрировали эффективное продуцирование IFN- γ по сравнению с контролем. На фиг.2В, клетки CTL во всех лунках, стимулированные Foxp3-A2-10-233 (SEQ ID NO:28), в лунках с номерами #6 и #7, стимулированные Foxp3-A2-10-152 (SEQ ID NO:29), #5, стимулированные Foxp3-A2-10-77 (SEQ ID NO:30), и #1, стимулированные Foxp3-A2-10-246 (SEQ ID NO:37) и Foxp3-A2-10-94 (SEQ ID NO:27), продемонстрировали

эффективное продуцирование IFN- γ по сравнению с контролем.

Фиг.2С. На фиг.2С, клетки CTL в лунках с номерами #1, #2, #4, #5, #7, #9, #11 и #12, стимулированные Foxp3-A2-9-390 (SEQ ID NO:15), #5 и #11, стимулированные Foxp3-A2-9-304 (SEQ ID NO:19), #7, стимулированные Foxp3-A2-9-68 (SEQ ID NO:7), и #12, стимулированные Foxp3-A2-9-252 (SEQ ID NO:17), продемонстрировали эффективное продуцирование IFN- γ по сравнению с контролем.

Фиг.3А-D. На фиг.3 показано, что клетки в положительных лунках были размножены и был осуществлен анализ IFN- γ -ELISA. На фиг.3А, В и С, клеточные линии CTL, стимулированные Foxp3-A02-9-390 (SEQ ID NO:15) (сплошной ромб), продемонстрировали эффективное продуцирование IFN- γ по сравнению с контролем (сплошной квадрат). На фиг.3D, клеточные линии CTL, стимулированные Foxp3-A02-9-252 (SEQ ID NO:17) (сплошной ромб), продемонстрировали эффективное продуцирование IFN- γ по сравнению с контролем (сплошной квадрат).

Фиг.3Е-G. На фиг.3Е, клеточные линии CTL, стимулированные Foxp3-A24-10-60 (SEQ ID NO:74) (сплошной ромб), продемонстрировали эффективное продуцирование IFN- γ по сравнению с контролем (сплошной квадрат). На фиг.3F клеточные линии CTL, стимулированные Foxp3-A02-10-94 (SEQ ID NO:27) (сплошной ромб), продемонстрировали эффективное продуцирование IFN- γ по сравнению с контролем (сплошной квадрат). На фиг.3G клеточные линии CTL, стимулированные Foxp3-A24-10-87 (SEQ ID NO:67) (сплошной ромб), продемонстрировали эффективное продуцирование IFN- γ по сравнению с контролем (сплошной квадрат).

Фиг.4. На фиг.4 показана специфичная активность клеток CTL в отношении клеток-мишеней, эндогенно экспрессирующих Foxp3 и HLA-A* 02 или 24. На фиг.4А и В, клеточные линии CTL, выращенные в присутствии Foxp3-A02-9-390 (SEQ ID NO:15) и Foxp3-A02-9-252 (SEQ ID NO:17), продемонстрировали высокоспецифичную активность клеток CTL в отношении клеток 293Т, которые были трансфицированы с помощью обоих генов Foxp3 и HLA-A02. С другой стороны, не было продемонстрировано существенной специфичной активности клеток CTL в отношении контролей. На фиг.4С, клеточные линии CTL, выращенные в присутствии Foxp3-A02-9-252 (SEQ ID NO:17) продемонстрировали высокоспецифичную активность клеток CTL в отношении клеток 293Т, которые были трансфицированы с помощью обоих генов Foxp3 и HLA-A24. С другой стороны, не было продемонстрировано существенной специфичной активности клеток CTL в отношении контролей.

Фиг.5. На фиг.5 показан *in vivo* анализ иммуногенности пептида Foxp3-252_h и пептида Foxp3-252_m. IFA-конъюгированный пептид или индивидуально IFA вводили подкожно мышам BALB/c в дни 0 и 7. На 14 день спленоциты вакцинированных мышей собирали и использовали в качестве клеток-респондеров. 1×10^4 RLmale1 клеток, стимулированных соответствующим пептидом (сплошной квадрат) или в отсутствие пептида (не закрашенный квадрат), использовали для анализа IFN- γ -ELISPOT. Вакцинацию с использованием Foxp3-252_h (А) и Foxp3-252_m (В) осуществляли пяти мышам (M1-M5) и в качестве контроля в каждом анализе осуществляли инъекцию IFA в отсутствие какого-либо пептида трем мышам (N1-N3).

Фиг.6. На фиг.6 показаны *in vivo* противоопухолевые эффекты вакцинации с использованием пептида эпитопа Foxp3. 1×10^5 клеток клеточной линии 4Т1 рака груди вводили мышам BALB/c в день 0. IFA-конъюгированный пептид Foxp3-252_h (-не закрашенный круг-), IFA-конъюгированный пептид Foxp3-252_m (-сплошной квадрат-), индивидуально IFA в отсутствие пептида (-сплошной треугольник-) вводили в дни 3 и 10. В качестве контроля нормального роста опухоли в этом анализе также

получали невакцинированных мышей (-х-). Наблюдали существенное отличие в подавлении роста опухоли при вакцинации с помощью пептида эпитопа Foxp3. *, $P < 0,01$; **, $P < 0,005$.

Фиг.7А-В. На фиг.7 показан анализ аффинности пептида Foxp3-9-252, содержащего замены, в отношении молекулы HLA. На фиг.7А клетки CTL, индуцированные Foxp3-9-252-WT, распознают клетки, презентующие пептид Foxp3-9-252-9V на молекуле HLA-A2. Осуществляли IFN- γ -ELISPOT анализ с использованием клеточной линии CTL, индуцированной пептидом Foxp3-9-252-WT, в качестве клеток-респондеров, и клеток Т2, стимулированных пептидом Foxp3-9-252-WT или пептидом Foxp3-9-252-9V, в качестве стимулирующих клеток соответственно. Клетки Т2 без стимулирования пептидом получали в качестве контроля. На фиг.7В Foxp3-9-252-9V и Foxp3-9-252-WT продемонстрировали сходную аффинность в отношении молекулы HLA-A2. Осуществляли анализ IFN- γ -ELISA с использованием клеточной линии CTL, индуцированной пептидом Foxp3-9-252-WT, в качестве клеток-респондеров (1×10^5 клеток/лунка), и клеток Т2, стимулированных пептидом Foxp3-9-252-WT (-сплошной круг-), пептидом Foxp3-9-252-9V (-не закрашенный круг-) или HIV-A02 (-сплошной треугольник-), в качестве стимулирующих клеток (1×10^4 клеток/лунка). Пептидное стимулирование стимулирующих клеток проводили при 37 градусах по Цельсию в течение 2 часов с каждым типом пептида и с каждой концентрацией пептида.

Фиг.7С-D. На фиг.7С клетки CTL могли быть индуцированы с помощью стимулирования пептидом Foxp3-9-252, содержащим замены, нацеленного на молекулу HLA-A2. Клетки CTL для всех пептидов, содержащих замены, нацеленных на молекулу HLA-A2, получали таким способом, как описано в разделе "Материалы и способы". Клетки в лунках с номерами 3 и 7, стимулированные Foxp3-9-252-3M, в лунке под номером 7, стимулированные Foxp3-9-252-3L, и в лунке под номером 8, стимулированные Foxp3-9-252-9V, продемонстрировали продуцирование IFN- γ по сравнению с контролем. На фиг.7D клетки CTL, полученные с помощью Foxp3-9-252-9V, распознают стимулирующие клетки, покрытые пептидом Foxp3-9-252-WT. Клеточную линию CTL, индуцированную с помощью Foxp3-9-252-9V-пептида, использовали в качестве клеток-респондеров. Клетки Т2, инкубированные в присутствии пептида Foxp3-9-252-9V (-сплошной круг-), или в присутствии пептида Foxp3-9-252-WT (-не закрашенный круг-), или в отсутствие пептида (-не закрашенный квадрат-), использовали в данном анализе в качестве стимулирующих клеток (1×10^4 клеток/лунка).

Подробное описание изобретения

I. Определения

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" используются в описании взаимозаменяемо и означают полимер, состоящий из аминокислотных остатков. Термины применяют к аминокислотным полимерам, в которых один или несколько аминокислотных остатков являются модифицированными остатками или синтетическими остатками, например, к искусственному химическому миметику соответствующей природной аминокислоты, кроме того, термины применяют к природным аминокислотным полимерам.

Как используется в настоящем описании, термин "аминокислота" означает природные и синтетические аминокислоты, а также аналоги аминокислот и миметики аминокислот, которые функционируют подобно природным аминокислотам. Природные аминокислоты представляют собой аминокислоты, которые кодируются генетическим кодом, а также аминокислоты, модифицированные после трансляции в

клетках (например, гидроксипролин, γ -карбоксиглутамат и О-фосфосерин). Термин "аналог аминокислоты" означает соединения, которые имеют такую же основную химическую структуру (атом альфа-углерода, связанный с водородом, карбоксигруппа, аминогруппа и R-группа), как и природная аминокислота, но имеют модифицированную R-группу или модифицированные остовы (например, гомосерин, норлейцин, метионин сульфоксид, метионин метилсульфоний). Термин "миметик аминокислоты" означает химические соединения, которые имеют отличную структуру, но функцию, сходную с функцией основных аминокислот.

Аминокислоты обозначаются в данном случае с помощью общеизвестных трехбуквенных символов или однобуквенных символов, рекомендованных Комиссией Биохимической Номенклатуры IUPAC-IUB.

Термины "ген", "полинуклеотиды", "нуклеотиды" и "нуклеиновые кислоты" используются взаимозаменяемо, если не указано иное, и аналогично аминокислотам обозначаются с помощью общепринятых однобуквенных кодов.

Если не указано иного, все технические и научные термины, используемые в описании, имеют значение, общепринятое в кругу специалистов в данной области, к которой относится настоящее изобретение. В случае возникновения разночтения настоящее описание, в том числе определения, следует истолковывать как руководство.

II. Пептиды

Для того чтобы продемонстрировать, что пептиды, полученные из Foxp3, функционируют как антигены, распознаваемые цитотоксическими Т-клетками (CTL), в настоящем изобретении были проанализированы пептиды, которые являются подпоследовательностями Foxp3, на предмет того, являются ли они антигенными эпитопами, ограниченными HLA-A24 или HLA-A02, которые являются широко распространенными на земле HLA-аллелями (Date Y et al., Tissue Antigens 47: 93-101, 1996; Kondo A et al., J Immunol 155: 4307-12, 1995; Kubo RT et al., J Immunol 152: 3913-24, 1994). Возможные HLA-A24- и HLA-A02-связывающие пептиды, которые являются подпоследовательностями Foxp3, идентифицировали на основе информации об аффинности связывания с HLA-A24 и HLA-A02. После *in vitro* стимуляции Т-клеток дендритными клетками (DC), инкубированными с этими пептидами, успешно получали клетки CTL, используя последовательности:

Foxp3-A24-9-363 (SEQ ID NO:3),
 Foxp3-A24-9-366 (SEQ ID NO:7),
 Foxp3-A24-9-190 (SEQ ID NO:9),
 Foxp3-A24-9-207 (SEQ ID NO:4),
 Foxp3-A24-9-332 (SEQ ID NO:5),
 Foxp3-A24-9-337 (SEQ ID NO:8),
 Foxp3-A24-10-114 (SEQ ID NO:12),
 Foxp3-A2-9-390 (SEQ ID NO:15),
 Foxp3-A2-9-69 (SEQ ID NO:16),
 Foxp3-A2-9-252 (SEQ ID NO:17),
 Foxp3-A2-10-359 (SEQ ID NO:22),
 Foxp3-A2-10-263 (SEQ ID NO:24),
 Foxp3-A2-10-94 (SEQ ID NO:27),
 Foxp3-A2-10-233 (SEQ ID NO:28),
 Foxp3-A2-10-152 (SEQ ID NO:29),
 Foxp3-A2-10-77 (SEQ ID NO:30),

Foxp3-A2-10-246 (SEQ ID NO:37),
 Foxp3-A2-9-68 (SEQ ID NO:18),
 Foxp3-A2-9-304 (SEQ ID NO:19),
 Foxp3-A24-10-87 (SEQ ID NO:67) и
 Foxp3-A24-10-60 (SEQ ID NO:74).

Полученные клетки CTL показали эффективную специфичную CTL-активность в отношении клеток-мишеней, стимулированных пептидом. Эти результаты согласуются с выводом о том, что Foxp3 является антигеном, распознаваемым

клетками CTL, и что последовательности

Foxp3-A24-9-363 (SEQ ID NO:3),
 Foxp3-A24-9-366 (SEQ ID NO:7),
 Foxp3-A24-9-190 (SEQ ID NO:9),
 Foxp3-A24-9-207 (SEQ ID NO:4),
 Foxp3-A24-9-332 (SEQ ID NO:5),
 Foxp3-A24-9-337 (SEQ ID NO:8),
 Foxp3-A24-10-114 (SEQ ID NO:12),
 Foxp3-A2-9-390 (SEQ ID NO:15),
 Foxp3-A2-9-69 (SEQ ID NO:16),
 Foxp3-A2-9-252 (SEQ ID NO:17),
 Foxp3-A2-10-359 (SEQ ID NO:22),
 Foxp3-A2-10-263 (SEQ ID NO:24),
 Foxp3-A2-10-94 (SEQ ID NO:27),
 Foxp3-A2-10-233 (SEQ ID NO:28),
 Foxp3-A2-10-152 (SEQ ID NO:29),
 Foxp3-A2-10-77 (SEQ ID NO:30),
 Foxp3-A2-10-246 (SEQ ID NO:37),
 Foxp3-A2-9-68 (SEQ ID NO:18),
 Foxp3-A2-9-304 (SEQ ID NO:19),
 Foxp3-A24-10-87 (SEQ ID NO:67) и

Foxp3-A24-10-60 (SEQ ID NO:74) представляют собой пептиды эпитопов, ограниченных HLA-A24 и HLA-A2. Так как Foxp3 экспрессируется в клетках большинства пациентов, больных раком, и связан с иммуносупрессией, индуцированной иммуносупрессивными факторами опухолями, то Foxp3 представляет собой приемлемую мишень для иммунотерапии с целью стимулирования клинической эффективности антиген-специфичной противораковой иммунотерапии.

Таким образом, настоящее изобретение относится к нонапептидам (пептидам, состоящим из девяти аминокислотных остатков) и декапептидам (пептидам, состоящим из десяти аминокислотных остатков). Пептиды Foxp3 по изобретению связываются с молекулой HLA и индуцируют цитотоксическую активность цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL). Более конкретно, настоящее изобретение относится к пептидам, состоящим из аминокислотной последовательности, выбранной из группы последовательностей SEQ ID NO:3-5, 7-9, 12, 15-19, 22, 24, 27-30, 37, 67 или 74.

Как правило, для компьютерного расчета аффинности связывания различных пептидов и антигенов HLA и может использоваться программное обеспечение, доступное в настоящий момент из сети Интернет, например программы, описанные у Parker KC. et al, в J Immunol. 1994 Jan 1; 152(1): 163-75. Аффинность связывания с антигенами HLA может измеряться *in vitro*, как описано, например, у Parker KC. et al, в J Immunol. 1994 Jan 1; 152(1):163-75.; Nukaya I. et al, Int J Cancer. 1999 Jan 5; 80(1):92-7.;

Kuzushima K, et al. (2001) *Blood*, 98(6):1872-81.; *Journal of Immunological Methods*, 1995, 185: 181-190.; *Protein Science*, 2000, 9: 1838-1846).

Кроме того, пептиды Foxp3 по настоящему изобретению могут фланкироваться дополнительными аминокислотными остатками при условии сохранения пептидами Foxp3 способности индуцировать клетки CTL. Такие пептиды, обладающие способностью индуцировать клетки CTL, могут содержать менее чем примерно 40 аминокислот, например менее чем примерно 20 аминокислот, например менее чем примерно 15 аминокислот. Аминокислотная последовательность, фланкирующая пептиды, состоящие из аминокислотной последовательности, выбранной из группы последовательностей SEQ ID NO:3-5, 7-9, 12, 15-19, 22, 24, 27-30, 37, 67 и 74, не ограничена и может содержать аминокислоты любого типа, если они не ингибируют способность пептида индуцировать клетки CTL. Таким образом, настоящее изобретение также относится к пептидам, обладающим способностью индуцировать клетки CTL, причем пептиды включают аминокислотную последовательность, выбранную из группы последовательностей SEQ ID NO:3-5, 7-9, 12, 15-19, 22, 24, 27-30, 37, 67 и 74.

По существу, известно, что модификация одной или нескольких аминокислот в белке не влияет на функцию белка или в некоторых случаях даже усиливает желаемую функцию исходного белка. Фактически известно, что модифицированные пептиды (т.е. пептиды, содержащие аминокислотную последовательность, модифицированную заменой или вставкой одной, двух или нескольких аминокислотных остатков в исходную указанную последовательность) сохраняют биологическую активность исходного пептида (Mark et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 5662-6, 1984; Zoller and Smith, *Nucleic Acids Res* 10: 6487-500, 1982; Dalbadie-McFarland et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 6409-13, 1982. Таким образом, в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения пептид, обладающий способностью индуцировать клетки CTL, по настоящему изобретению может содержать аминокислоты, включающие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3-5, 7-9, 12, 15-19, 22, 24, 27-30, 37, 67 или 74, где одна или несколько аминокислот вставлены и/или заменены.

Специалисту в данной области будет понятно, что индивидуальные вставки или замены в аминокислотной последовательности, которые изменяют одну аминокислоту или небольшой процент аминокислот, приводят в результате к сохранению свойств аминокислотной боковой цепи; их, таким образом, обозначают как "консервативная замена" или "консервативная модификация", при этом изменение белка приводит в результате к получению белка с подобными функциями. Таблицы консервативных замен, на которых представлены функционально подобные аминокислоты, хорошо известны в данной области. Примеры свойств аминокислотных боковых цепей представляют собой гидрофобные аминокислоты (A, I, L, M, F, P, W, Y, V), гидрофильные аминокислоты (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T) и боковые цепи, содержащие совокупно следующие функциональные группы или характеристики: алифатическую боковую цепь (G, A, V, L, I, P); боковую цепь, содержащую гидроксильную группу (S, T, Y); боковую цепь, содержащую атом серы (C, M); боковую цепь, содержащую карбоновую кислоту и амид (D, N, E, Q); боковую цепь, содержащую основание (R, K, H); и боковую цепь, содержащую ароматическую группу (H, F, Y, W). Кроме того, каждая из следующих восьми групп содержит аминокислоты, которые представляют собой консервативные замены друг другу:

- 1) аланин (A), глицин (G);
- 2) аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E);

- 3) аспарагин (N), глутамин (Q);
- 4) аргинин (R), лизин (K);
- 5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V);
- 6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W);
- 7) серин (S), треонин (T) и
- 8) цистеин (C), метионин (M) (см., например, Creighton, Proteins (1984)).

Такие консервативно модифицированные пептиды также рассматриваются как пептиды по настоящему изобретению. Однако пептид по настоящему изобретению не ограничен ими и может включать неконсервативные модификации, при условии, что пептид сохраняет способность индуцировать клетки CTL. Кроме того, модифицированные пептиды не исключают CTL-индуцируемые пептиды полиморфных вариантов, межвидовых гомологов и аллелей Foxp3.

Специалист может модифицировать (вставить или заменить) только небольшое количество (например, 1, 2 или несколько) или небольшой процент аминокислотных остатков, сохраняя требуемую способность индуцировать клетки CTL (т.е. активировать CTL). В данном случае термин "несколько" означает 5 или менее или, например, 3 или менее. Процент модифицированных аминокислотных остатков может составлять 20% или менее, например 15% или 10% или менее, например 1-5% всех аминокислот последовательностей SEQ ID NO:3-5, 7-9, 12, 15-19, 22, 24, 27-30, 37, 67 и 74. В настоящем изобретении рассматриваются пептиды Foxp3, обладающие по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% аминокислотной идентичностью последовательности со всеми идентифицированными последовательностями.

Идентичность последовательности может быть измерена с использованием любого алгоритма, известного в данной области, например BLAST, доступного через Национальный Центр Биотехнологической Информации (по адресу ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi).

Анализ гомологии (т.е. идентичности последовательности) представленных пептидов

Foxp3-A24-9-363 (SEQ ID NO:3),
 Foxp3-A24-9-366 (SEQ ID NO:7),
 Foxp3-A24-9-190 (SEQ ID NO:9),
 Foxp3-A24-9-207 (SEQ ID NO:4),
 Foxp3-A24-9-332 (SEQ ID NO:5),
 Foxp3-A24-9-337 (SEQ ID NO:8),
 Foxp3-A24-10-114 (SEQ ID NO:12),
 Foxp3-A2-9-390 (SEQ ID NO:15),
 Foxp3-A2-9-69 (SEQ ID NO:16),
 Foxp3-A2-9-252 (SEQ ID NO:17),
 Foxp3-A2-10-359 (SEQ ID NO:22),
 Foxp3-A2-10-263 (SEQ ID NO:24),
 Foxp3-A2-10-94 (SEQ ID NO:27),
 Foxp3-A2-10-233 (SEQ ID NO:28),
 Foxp3-A2-10-152 (SEQ ID NO:29),
 Foxp3-A2-10-77 (SEQ ID NO:30),
 Foxp3-A2-10-246 (SEQ ID NO:37),
 Foxp3-A2-9-68 (SEQ ID NO:18),
 Foxp3-A2-9-304 (SEQ ID NO:19),
 Foxp3-A24-10-87 (SEQ ID NO:67) и

Foxp3-A24-10-60 (SEQ ID NO:74) показал, что они не имеют существенной гомологии с пептидами, полученными из любых других известных генных продуктов. Это снижает возможность неизвестных или нежелательных иммунных ответов при использовании для иммунотерапии.

Как используется в иммунотерапии, пептиды по настоящему изобретению будут представлены на поверхности клетки или экзосомы в виде комплекса с антигеном HLA. Таким образом, выбирают пептиды, обладающие высокой аффинностью связывания с антигеном HLA кроме их способности индуцировать клетки CTL. Более того, пептиды могут быть модифицированы заменой, вставкой и подобными модификациями аминокислотных остатков с достижением более высокой аффинности связывания. Кроме пептидов, которые обнаруживаются естественным образом, так как известна закономерность (т.е. соответствие) последовательностей пептидов, обнаруживающихся при связывании с антигенами HLA (J Immunol 152: 3913, 1994; Immunogenetics 41: 178, 1995; J Immunol 155: 4307, 1994), могут быть осуществлены модификации иммуногенных пептидов по изобретению на основе такой закономерности. Например, пептиды, проявляющие высокую аффинность связывания HLA-A24, могут содержать замену второй аминокислоты с N-конца на фенилаланин, тирозин, метионин или триптофан, а также пептиды, аминокислота которых с C-конца заменена на фенилаланин, лейцин, изолейцин, триптофан или метионин. С другой стороны, пептиды, у которых вторая аминокислота с N-конца заменена на лейцин или метионин и у которых C-концевая аминокислота заменена на валин или лейцин, могут использоваться в качестве пептидов, обладающих высокой аффинностью связывания HLA-A02. Замену осуществляют не только концевых аминокислот, но также в положении возможного сайта TCR-распознавания пептидов. В статье Zaremba et al. показано, что аминокислотные замены в пептиде CAP1 могут быть эквивалентны или лучше, чем у исходного пептида (Cancer Res. 57, 4570-4577, 1997). Например, пептид, содержащий замены, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:95, 97 или 98. Кроме того, на N- и/или C-конце пептидов также могут быть добавлены одна или две аминокислоты. Такие модифицированные пептиды с высокой аффинностью связывания антигена HLA также включены в настоящее изобретение.

Однако, если последовательность пептида идентична части аминокислотной последовательности эндогенного или экзогенного белка, с отличной функцией, то могут возникать побочные эффекты, такие как аутоиммунные нарушения или аллергические реакции в отношении определенных веществ. Таким образом, поиск гомологии может осуществляться с использованием доступных баз данных, чтобы избежать, уменьшить или минимизировать ситуации, при которых последовательность пептида имеет гомологичную аминокислотную последовательность с другим белком. Если при поиске гомологии становится ясно, что не существует пептида, имеющего 1 или 2 отличия по аминокислотам по сравнению с заданным пептидом, то заданный пептид может быть модифицирован для увеличения аффинности связывания с антигенами HLA и/или увеличения способности индуцировать клетки CTL без какой-либо опасности побочных эффектов.

Пептиды, обладающие аффинностью связывания с антигенами HLA, как описано выше, являются высокоэффективными. Возможные пептиды, которые выбирают по наличию высокой аффинности связывания, также могут быть проанализированы на фактическое присутствие способности индуцировать клетки CTL. В данном случае фраза "способность индуцировать клетки CTL" указывает на способность пептида

индуцировать клетки CTL, если он представлен на антиген-презентирующих клетках. Кроме того, "способность индуцировать клетки CTL" включает способность пептида индуцировать активацию клеток CTL, пролиферацию клеток CTL и включает способность пептида повышать продукцию IFN- γ .

5 Подтверждение способности индуцировать клетки CTL может быть осуществлено путем индукции антиген-презентирующих клеток, несущих антигены МНС человека (например, В-лимфоцитов, макрофагов и дендритных клеток), или, более конкретно, дендритных клеток, полученных из мононуклеарных лейкоцитов периферической
10 крови человека, и после стимулирования пептидами путем смешивания с CD8-положительными клетками и последующего измерения IFN- γ , продуцированного и высвобожденного клетками CTL против клеток-мишеней. В качестве реакционной системы может использоваться трансгенное животное, которое получено для экспрессии антигена HLA человека (например, описанные BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auye C, Low L, Primus J, Diamond DJ, в Hum Immunol 61(8): 764-79, 2000,
15 август, связанные статьи, книги, Link out Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA A*0201/DR1 transgenic mice: dependence on HLA class II restricted T(H) response). Например, клетки-мишени могут быть радиоактивно мечеными ^{51}Cr и тому
20 подобное, и цитотоксическая активность может быть рассчитана исходя из радиоактивности, высвобожденной из клеток-мишеней. Альтернативно, активность может быть определена путем измерения IFN- γ , полученного и выделенного клетками CTL в присутствии антиген-презентирующих клеток, которые несут иммобилизованные пептиды, и с помощью визуализации в среде зоны ингибирования
25 с использованием моноклональных антител против IFN- γ .

В результате определения у пептидов способности индуцировать клетки CTL, как описано выше, было установлено, что пептиды, обладающие высокой аффинностью связывания в отношении антигена HLA, необязательно обладают высокой
30 способностью индуцировать клетки. Кроме того, нонапептиды или декапептиды, выбранные из пептидов, содержащих аминокислотные последовательности, обозначенные последовательностями SEQ ID NO:3-5, 7-9, 12, 15-19, 22, 24, 27-30, 37, 67 или 74, показали особенно высокую способность индуцировать клетки CTL, а также высокую аффинность связывания с антигеном HLA.

35 Кроме вышеуказанной модификации пептидов по настоящему изобретению, пептиды по настоящему изобретению могут быть дополнительно связаны с другими веществами, при условии сохранения способности индуцировать клетки CTL. Используемые вещества включают: пептиды, липиды, сахара и цепи сахаров,
40 ацетильные группы, природные и синтетические полимеры и т.д. Пептиды могут содержать модификации, такие как гликозилирование, окисление боковой цепи или фосфорилирование; при условии, что модификации не нарушают биологической активности пептидов, как описано выше. Такие типы модификаций могут осуществляться для придания дополнительных функций (например, направляющей
45 функции и функции доставки) или для стабилизации полипептида.

Например, как известно в данной области, для увеличения *in vivo* стабильности полипептида вводят подходящие разнообразные D-аминокислоты, аминокислотные миметики или неприродные аминокислоты; данная концепция также может быть
50 адаптирована для полипептидов по настоящему изобретению. Стабильность полипептида может оцениваться рядом способов. Например, для определения стабильности использовали пептидазы и разнообразные биологические среды, такие как плазма и сыворотка человека (см., например, публикацию Verhoef et al., Eur J Drug

Metab Pharmacokin 11: 291-302, 1986).

III. Получение пептидов

Пептиды по изобретению могут быть получены с использованием хорошо известных методов. Например, пептиды могут быть получены синтетически, технологиями рекомбинантной ДНК или химическим синтезом. Пептиды по изобретению могут быть синтезированы независимо или в виде более длинных полипептидов, включая два или несколько пептида (например, два или несколько пептидов Foxp3 или пептид Foxp3 и пептид, отличный от пептида Foxp3). Пептиды могут быть выделены, т.е. очищены, и являются, по существу, свободными от других природных белков клетки-хозяина и их фрагментов, например, могут быть очищены по меньшей мере примерно на 70%, 80% или 90%.

Пептид по настоящему изобретению может быть получен химическим синтезом на основе выбранной аминокислотной последовательности. Например, подходящие способы пептидного синтеза, которые могут быть использованы для синтеза, включают:

- (i) Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966;
- (ii) The Proteins, Vol. 2, Academic Press, New York, 1976;
- (iii) Peptide Synthesis (in Japanese), Maruzen Co., 1975;
- (iv) Basics and Experiment of Peptide Synthesis (in Japanese), Maruzen Co., 1985;
- (v) Development of Pharmaceuticals (second volume) (in Japanese), Vol. 14 (peptide synthesis), Hirokawa, 1991;
- (vi) WO99/67288; и
- (vii) Barany G. & Merrifield R.B., Peptides Vol. 2, "Solid Phase Peptide Synthesis", Academic Press, New York, 1980, 100-118.

Альтернативно, пептиды по настоящему изобретению могут быть получены, используя любые известные способы генной инженерии, предназначенные для получения пептидов (например, Morrison J. (1977) J. Bacteriology 132: 349-51; Clark-Curtiss & Curtiss (1983) Methods in Enzymology (eds. Wu et al.) 101: 347-62). Например, сначала получают подходящий вектор, несущий полинуклеотид, кодирующий мишеневый пептид, в экспрессируемой форме (например, расположенной ниже регуляторной последовательности, соответствующей промоторной последовательности) и трансформируют в подходящую клетку-хозяина. Затем клетку-хозяина культивируют с получением представляющего интерес пептида. Пептиды также могут быть получены с использованием *in vitro*-систем трансляции.

IV. Полинуклеотиды

Настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, которые кодируют любой из вышеуказанных пептидов по настоящему изобретению. К ним относятся полинуклеотиды, выделенные из природного гена Foxp3, и полинуклеотиды, содержащие консервативно модифицированную нуклеотидную последовательность. В данном случае фраза "консервативно модифицированная нуклеотидная последовательность" означает последовательность, которая кодирует, по существу, идентичные аминокислотные последовательности. Из-за вырожденности генетического кода большое количество функционально идентичных нуклеиновых кислот кодирует любой заданный белок. Например, все перечисленные кодоны GCA, GCC, GCG и GCU кодируют аминокислоту аланин. Таким образом, в каждом положении, в котором аланин определяется кодоном, кодон может быть изменен на любой соответствующий кодон без изменения кодируемого полипептида. Такие изменения в нуклеиновой кислоте являются "молчащими вариантами" и представляют

собой один из видов консервативно модифицированных вариантов. Каждая последовательность нуклеиновой кислоты, представленная в настоящем описании, которая кодирует пептид, также описывает любой возможный «молчащий вариант» нуклеиновой кислоты. Специалисту будет понятно, что каждый кодон нуклеиновой кислоты (за исключением AUG, который обычно является единственным кодоном для метионина, и TGG, который обычно является единственным кодоном для триптофана) может быть модифицирован с получением функционально идентичной молекулы. Соответственно, каждый «молчащий вариант» нуклеиновой кислоты, который кодирует пептид, описан в неявном виде для каждой описанной последовательности.

Полинуклеотид по настоящему изобретению может состоять из ДНК, РНК и их производных. ДНК обычно состоит из оснований, таких как А, Т, С и G. Т заменяется на U в РНК.

Полинуклеотиды Foxp3 по настоящему изобретению могут кодировать множество пептидов Foxp3 по настоящему изобретению со вставками или без вставок аминокислотных последовательностей между ними. Например, вставленная аминокислотная последовательность может представлять собой сайт расщепления (например, последовательность, распознаваемая ферментом) полинуклеотида или транслированных пептидов. Кроме того, полинуклеотиды могут содержать любые дополнительные последовательности кроме кодирующей последовательности пептида по настоящему изобретению. Например, полинуклеотиды могут представлять собой рекомбинантные полинуклеотиды, которые содержат регуляторные последовательности, необходимые для экспрессии пептида. Как правило, такие рекомбинантные полинуклеотиды могут быть получены путем манипуляций с полинуклеотидами посредством подходящих рекомбинантных методов с использованием, например, полимераз и эндонуклеаз.

Оба способа синтеза, рекомбинантный и химический, могут использоваться для получения полинуклеотидов по настоящему изобретению. Например, полинуклеотиды могут быть получены вставкой в подходящий вектор, который может экспрессироваться при трансфекции в компетентную клетку. Альтернативно, полинуклеотиды могут быть амплифицированы с использованием методов ПЦР или с помощью экспрессии в подходящих организмах-хозяевах (см., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989). Альтернативно, полинуклеотиды могут быть синтезированы с использованием твердофазных методов, описанных у Beaucage S.L. & Iyer R.P., в *Tetrahedron* 48: 2223-311, 1992; Matthes et al., *EMBO J* 3: 801-5, 1984.

V. Фармацевтические средства

Так как Foxp3 был идентифицирован как молекула регуляторных Т-клеток (T-reg), функция которых состоит в поддержании иммунного гомеостаза, то пептиды Foxp3 или полинуклеотиды, кодирующие пептиды Foxp3, по настоящему изобретению могут использоваться для регуляции клеток T-reg. Таким образом, настоящее изобретение относится к фармацевтическому средству для регуляции клеток T-reg, которое содержит в качестве активного ингредиента один или несколько пептидов по настоящему изобретению или полинуклеотидов, кодирующих эти пептиды.

В данном случае под "регуляцией" клеток T-reg понимают модификацию состояния клеток T-reg *in vivo*, например, путем ингибирования пролиферации или подавления функции клеток T-reg. Считается, что клетка T-reg является одним из главных участников, задействованных в подавлении разнообразных типов иммунного ответа, и под "подавлением функции клеток T-reg" в данном случае понимают уменьшение

способности клеток T-reg подавлять иммунный ответ. В частности, функция клеток T-reg в периферической крови представляет собой так называемую периферическую толерантность (Miescher S et al., J Immunol 136: 1899-907, 1986; Young RC et al., Am J Med 52: 63-72, 1972; Alexander JP et al., Cancer Res 53: 1380-7, 1997; Horiguchi S et al., Cancer Res 59: 2950-6, 1999; Kono K et al., Clin Cancer Res 11: 1825-8, 1996; Kiessling R et al., Cancer Immunol Immunother 48: 353-62, 1999; Fontenot JD et al., Nat Immunol 4: 330-6, 2003, Hori S et al., Science 299: 1057-61, 2003; Khattri R et al., Nat Immunol 4: 304-6, 2003).

Клетки T-reg обеспечивают иммуносупрессивный эффект, например, у пациентов, больных раком. Таким образом, пептиды Foxp3 по настоящему изобретению, сверх-экспрессирующиеся в клетках T-reg, или полинуклеотиды, кодирующие пептиды Foxp3, могут использоваться в качестве фармацевтического средства (например, вакцины) для лечения рака.

В настоящем изобретении фраза "вакцина" (также означающая иммуногенную композицию) означает вещество, функция которого заключается в индукции противоопухолевого иммунитета или иммунитета для регуляции клеток T-reg при инокуляции животным.

Фармацевтические средства по настоящему изобретению могут использоваться для лечения и/или профилактики рака у индивидов, таких как человек или любое другое млекопитающее, включая, но, не ограничиваясь ими, мышь, крысу, морскую свинку, кролика, кошку, собаку, овцу, козу, свинью, крупный рогатый скот, лошадь, обезьяну, павиана и шимпанзе, в частности коммерчески важное животное или одомашненное животное.

Согласно настоящему изобретению полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3-5, 7-9, 12, 15-19, 22, 24, 27-30, 37, 67 или 74, представляют собой пептиды эпитопов, ограниченных HLA-A24- или HLA-A02, которые могут индуцировать эффективный и специфичный иммунный ответ в отношении клеток T-reg, экспрессирующих Foxp3. Таким образом, фармацевтические средства предназначены для введения индивидам, антиген HLA которых представляет собой или HLA-A24, или HLA-A02.

Рак, на который может быть направлено лечение с помощью фармацевтических средств по настоящему изобретению, не ограничен и включает все типы рака, при которых у индивида экспрессируется Foxp3. Характерные типы рака включают рак груди, миелобластный лейкоз (AML), рак мочевого пузыря, рак шейки матки, холангиоцеллюлярную карциному, хронический миелолейкоз (CML), рак толстой кишки и рак прямой кишки, эндометриоз, рак пищевода, рак желудка, рак желудка диффузного типа, рак печени, рак легкого, лимфому, нейробластому, остеосаркому, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак простаты, карциному почек, мелкоклеточный рак легкого, опухоль мягких тканей и опухоль яичек.

При необходимости фармацевтические средства по настоящему изобретению, состоящие или из пептида Foxp3, или из полинуклеотида, кодирующего этот пептид Foxp3, необязательно могут включать другие терапевтические средства в качестве активного ингредиента, при условии, что средство не ингибирует регулирующий эффект представляющего интерес пептида на клетку T-reg. Например, композиции могут содержать противовоспалительные средства, болеутоляющие средства, хемотерапевтические средства и тому подобное. Кроме включения в композицию других терапевтических средств, лекарственные средства по настоящему изобретению также могут вводиться последовательно или одновременно с одним или несколькими другими фармакологическими средствами. Количество лекарственного

средства и фармакологического средства зависит, например, от типа используемого фармакологического средства(в), от заболевания, на которое направлено лечение, и от схемы и пути введения.

5 Следует учитывать, что кроме ингредиентов, конкретно указанных в описании, фармацевтические средства по настоящему изобретению могут включать другие подходящие средства, известные в данной области, относящиеся к типу рассматриваемой композиции.

10 В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения фармацевтические средства настоящего изобретения могут быть включены в состав изделия и в наборы, содержащие материалы, используемые для лечения патологических состояний, на которые направлено лечение, например рака. Изделие может включать контейнер с любым из указанных фармацевтических средств с этикеткой. Подходящие контейнеры включают флаконы, ампулы и пробирки. Контейнеры могут быть сделаны из 15 разнообразных материалов, таких как стекло или пластик. На этикетке контейнера следует указать средство, используемое для лечения или профилактики одного или нескольких состояний. На этикетке также могут быть указаны руководства по применению и тому подобное.

20 Кроме контейнера, описанного выше, набор реагентов, содержащих фармацевтическое средство по настоящему изобретению, необязательно, может дополнительно включать второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый разбавитель. Он может дополнительно включать другие материалы, необходимые как с коммерческой, так и с пользовательской точки зрения, 25 включающие другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыш в упаковку с инструкциями по применению.

Фармацевтические композиции, если необходимо, могут быть представлены в упаковке или в распределительном устройстве, которые могут содержать одну или 30 несколько единичных дозированных форм, содержащих активный ингредиент. Упаковка, например, может включать металлическую или пластиковую фольгу, такую как блистерная упаковка. Упаковка или распределительное устройство могут сопровождаться инструкциями для введения.

35 (1) Фармацевтические средства, содержащие пептиды в качестве активного ингредиента

Пептиды по настоящему изобретению могут вводиться непосредственно в качестве фармакологического средства, если необходимо, которое составлено в композицию общепринятыми способами получения лекарственных средств. В таких случаях кроме 40 пептидов по настоящему изобретению при необходимости и без конкретных ограничений могут быть включены носители, эксципиенты и вещества, которые обычно используются для лекарственных средств. Примерами таких носителей являются стерилизованная вода, физиологический солевой раствор, фосфатный буфер, культуральная жидкость и тому подобное. Кроме того, фармацевтические средства 45 могут содержать при необходимости стабилизаторы, суспендирующие средства, консерванты, поверхностно-активные вещества и тому подобное. Фармацевтические средства по настоящему изобретению могут использоваться для лечения и/или профилактики рака, в частности для регуляции клеток T-reg.

50 Пептиды по настоящему изобретению могут быть получены в сочетании, которое содержит два или несколько пептидов Foxp3 по изобретению, для индукции клеток CTL in vivo. Пептиды Foxp3 могут быть представлены в виде смеси или могут быть конъюгированы друг с другом стандартными методами. Например, пептиды Foxp3

могут экспрессироваться в виде одной полипептидной последовательности. Пептиды в указанной комбинации могут быть одинаковыми или различными. Путем введения пептидов Foxp3 по настоящему изобретению пептиды презентуются на антигенах HLA антиген-презентирующих клеток с высокой плотностью, затем индуцируются клетки CTL, которые специфично взаимодействуют по отношению к комплексу, образованному обнаруженным пептидом и антигеном HLA.

Альтернативно, получают антиген-презентирующие клетки, которые содержат на своей клеточной поверхности иммобилизованные пептиды Foxp3 по настоящему изобретению, с помощью удаления у индивидов дендритных клеток, стимулированных пептидами по изобретению, клетки CTL индуцируются у индивидов при повторном введении индивидам несущих пептиды Foxp3 дендритных клеток, и в результате может увеличиваться агрессивность в отношении клеток-мишеней.

Фармацевтические средства для регуляции клеток T-reg, которые включают в качестве активного ингредиента пептид Foxp3 по настоящему изобретению, необязательно, могут включать адъювант, для эффективной адаптации клеточного иммунитета, или они могут быть введены с другими активными ингредиентами, и при этом они могут быть введены с помощью полученных лекарственных форм в гранулах. Адъювант означает соединение, которое усиливает иммунный ответ в отношении белка, при введении совместно (или последовательно) с белком, обладающим иммунологической активностью. Адъювант, который может использоваться, включает адъюванты, описанные в литературе (Clin Microbiol Rev 7: 277-89, 1994). Примеры адъювантов включают, но не ограничиваются ими, фосфат алюминия, гидроксид алюминия, квасцы, холерный экзотоксин, токсин сальмонеллы и тому подобное.

Кроме того, могут подходящим образом использоваться липосомные композиции, гранулярные композиции, в которых пептид Foxp3 связан с гранулами диаметром в несколько мкм, и композиции, в которых липид связан с пептидом.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическое средство по изобретению содержит компонент, который индуцирует цитотоксические Т-лимфоциты. Липиды были идентифицированы в качестве средств, способных индуцировать клетки CTL *in vivo* против вирусных антигенов. Например, остатки пальмитиновой кислоты могут присоединяться к эпсилон- и альфа-аминогруппам остатка лизина и затем связываться с пептидом по изобретению. Липидированный пептид может затем вводиться или непосредственно в мицелле или частице, будучи инкорпорированным в липосому или эмульгированным в адъювант. В качестве другого примера липида, индуцирующего ответы клеток CTL, для индукции клеток CTL могут использоваться липопротеины *E. coli*, такие как трипальмитоил-S-глицерилцистеинлизерил-серин (P3CSS), при ковалентном присоединении к подходящему пептиду (см., например, Deres et al., Nature 342: 561, 1989).

Способ введения может представлять собой пероральное введение, чрескожное, подкожное, внутривенную инъекцию или тому подобное и находят применение системное введение или местное применение в окружении сайтов-мишеней. Введение может осуществляться путем единственного введения или может повторяться путем множественных введений. Доза пептидов по настоящему изобретению может регулироваться подходящим образом в зависимости от заболевания, на которое необходимо направить лечение, возраста пациента, массы, способа введения и тому подобное и обычно составляет 0,001 мг-1000 мг, например 0,001 мг-1000 мг, например 0,1 мг-10 мг, и может вводиться от одного раза в каждые несколько дней до

одного раза в каждые несколько месяцев. Специалист в данной области сможет подходящим образом выбрать подходящую дозу.

(2) Фармацевтические средства, содержащие полинуклеотиды в качестве активного ингредиента

Фармацевтические средства по изобретению могут также содержать нуклеиновые кислоты в экспрессируемой форме, кодирующие описанные в настоящем описании пептиды Foxp3. В данном случае фраза "в экспрессируемой форме" означает, что полинуклеотид при введении в клетку будет экспрессироваться *in vivo* в виде полипептида, который индуцирует противоопухолевый иммунитет. В одном из вариантов осуществления последовательность нуклеиновой кислоты представляющего интерес полинуклеотида включает регуляторные элементы, необходимые для экспрессии полинуклеотида в клетке-мишени. Полинуклеотид(ы) может быть адаптирован для стабильного интегрирования в геном клетки-мишени (см., например, Thomas KR & Capecchi MR, Cell 51: 503-12, 1987 для описания векторов с кассетой для гомологичной рекомбинации). См., например, Wolff et al., Science 247: 1465-8, 1990; патенты США 5580859; 5589466; 5804566; 5739118; 5736524; 5679647; и WO 98/04720. Примеры технологий доставки на основе ДНК включают доставку с применением "голой" ДНК, облегченную доставку (опосредованную бупивакаином, полимерами, пептидами), доставку с применением катионно-липидных комплексов и опосредованную частицами ("генная пушка") или опосредованную давлением доставку (см., например, патент США 5922687).

Пептиды по изобретению также могут экспрессироваться с помощью вирусных или бактериальных векторов. Примеры экспрессирующих векторов включают ослабленных вирусных хозяев, таких как коровья оспа или оспа птиц. Этот способ включает использование вируса коровьей оспы, например, в качестве вектора для экспрессии нуклеотидных последовательностей, которые кодируют пептид. При введении в организм-хозяин рекомбинантный вирус коровьей оспы экспрессирует иммуногенный пептид, посредством чего вызывает иммунный ответ. Векторы на основе вируса коровьей оспы и способы, использующиеся в протоколах иммунизации, описаны, например в патенте США 4722848. Другой вектор представляет собой BCG (Bacille Calmette Guerin). BCG-векторы описаны Stover et al., в Nature 351: 456-60, 1991. Является очевидным широкое разнообразие других векторов, использующихся для терапевтического введения или иммунизации, например адено и адено-ассоциированные вирусные векторы, ретровирусные векторы, векторы *Salmonella typhi*, векторы на основе детоксифицированного токсина сибирской язвы и тому подобное. См., например, публикации Shata et al., Mol Med Today 6: 66-71, 2000; Shedlock et al. J Leukoc Biol 68: 793-806, 2000; Hipp et al., In Vivo 14: 571-85, 2000.

Доставка полинуклеотида пациенту может быть или непосредственной, в случае которой пациент подвергается непосредственному воздействию вектора, несущего полинуклеотид, или может быть косвенной, в случае которой клетки сначала трансформируют *in vitro* с помощью представляющего интерес полинуклеотида и затем трансплантируют пациенту. Эти два способа известны соответственно как *in vivo* или *ex vivo* генная терапия.

В качестве общих обзоров методов генной терапии, см. Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 12: 488-505, 1993; Wu and Wu, Biotherapy 3: 87-95, 1991; Tolstoshev, Ann Rev Pharmacol Toxicol 33: 573-96, 1993; Mulligan, Science 260: 926-32, 1993; Morgan & Anderson, Ann Rev Biochem 62: 191-217, 1993; Trends in Biotechnology 11(5): 155-215, 1993). Широко известные в данной области способы технологии рекомбинантной ДНК, которые

могут использоваться, описаны Ausubel et al., в Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, 1993; и Krieger, Gene Transfer и Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY, 1990.

Способ введения может представлять собой пероральное введение, чрескожное, подкожное, внутривенную инъекцию или тому подобное, и могут использоваться системное введение или местное применение в окружении сайтов-мишеней. Введение может осуществляться путем единственного введения или может повторяться путем множественных введений. Доза полинуклеотидов в подходящем носителе или доза клеток, трансформированных полинуклеотидом, кодирующим полипептиды по настоящему изобретению, может регулироваться подходящим образом в зависимости от заболевания, на которое необходимо направить лечение, возраста пациента, массы, способа введения и тому подобное, и обычно составляет 0,001 мг-1000 мг, например 0,001 мг-1000 мг, например 0,1 мг-10 мг, и может вводиться от одного раза в каждые несколько дней до одного раза в каждые несколько месяцев. Специалист в данной области сможет подходящим образом выбрать подходящую дозу.

(3) Экзосомы

Альтернативно, настоящее изобретение относится к внутриклеточным везикулам, называемым экзосомами, которые презентируют на своей поверхности комплексы, образованные пептидами по настоящему изобретению и антигенами HLA. Например, экзосомы могут быть получены с использованием способов, подробно описанных в опубликованном японском переводе международной заявки Hei 11-510507 и 2000-512161, и могут быть получены с использованием антиген-презентирующих клеток, полученных у индивидов, являющихся мишенями для лечения и/или профилактики заболевания. Экзосомы по настоящему изобретению могут инокулироваться в виде вакцин подобно пептидам по настоящему изобретению.

Тип используемых антигенов HLA должен соответствовать антигенам индивида, которому требуется лечение и/или профилактика заболевания. Например, для японцев наиболее подходящим является HLA-A24, конкретно HLA-A2402.

Что касается антигенов HLA, то использование типа A-24 или A-02, которые высоко экспрессируются у японцев и европейцев, является предпочтительным для получения эффективных результатов, и находят применение субтипы, включающие A-2402 и A-0201. В медицинской практике является характерным, что тип антигена HLA пациента, для которого требуется лечение, исследуется заранее, что дает возможность подходящего выбора пептидов, имеющих высокий уровень аффинности связывания с этим антигеном или обладающих способностью индуцировать цитотоксические Т-клетки (CTL) презентирующим антигеном. Кроме того, для того чтобы получить пептиды, проявляющие высокую аффинность связывания и способность индуцировать клетки CTL, можно осуществлять замену или введение 1, 2 или нескольких аминокислот на основе аминокислотной последовательности природного неполного пептида Foxp3.

(4) Антиген-презентирующие клетки

Настоящее изобретение также относится к антиген-презентирующим клеткам (APC), которые презентируют на своей поверхности комплексы, образованные антигенами HLA и пептидами по настоящему изобретению. APC, которые получают путем контактирования пептидов по настоящему изобретению или нуклеотидов, кодирующих эти пептиды по настоящему изобретению, могут быть получены у индивидов, являющихся мишенями для лечения и/или профилактики заболевания, и могут вводиться как вакцины индивидуально или в комбинации с другими

лекарственными средствами, включая пептиды по настоящему изобретению, экзосомы или цитотоксические Т-клетки.

АРС не ограничиваются каким-либо типом клеток и включают дендритные клетки (DC), клетки Лангеранса, макрофаги, В-клетки и активированные Т-клетки, причем о каждом из них известно, что они презентруют на своей клеточной поверхности белково-подобные антигены, чтобы быть распознанными лимфоцитами. Так как DC представляют собой репрезентативные клетки APC, обладающие сильнейшим CTL-индуцирующим воздействием среди клеток APC, то DC нашли конкретное применение в качестве клеток APC по настоящему изобретению.

Например, клетки APC могут быть получены путем индукции дендритных клеток из моноцитов периферической крови и последующего контактирования (стимулирования) их с пептидами по настоящему изобретению *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. Если пептиды по настоящему изобретению вводят индивиду, клетки APC, которые содержат на своей поверхности иммобилизованные пептиды по настоящему изобретению, индуцируются в организме индивида, причем "индукция клеток APC" включает контактирование (стимулирование) клетки с пептидами по настоящему изобретению или нуклеотидами, кодирующими эти пептиды по настоящему изобретению, для презентации на клеточной поверхности комплексов, образованных антигенами HLA и пептидами. Альтернативно, после иммобилизации пептидов по настоящему изобретению с клетками APC клетки APC могут вводиться индивиду в виде вакцины. Например, введение *ex vivo* может включать стадии: а) забора клеток APC у индивида и б) контактирование клеток APC стадии а) с пептидом.

Клетки APC, полученные на стадии б), могут вводиться индивиду в виде вакцины.

Согласно одному из аспектов настоящего изобретения клетки APC способны к индукции клеток CTL на высоком уровне. Такие клетки APC, способные к индукции цитотоксических Т-клеток на высоком уровне, могут быть получены способом, который включает стадию переноса генов, включающих полинуклеотиды, которые кодируют пептиды по настоящему изобретению, к клеткам APC *in vitro*. Введенные гены могут быть представлены в форме ДНК или РНК. В качестве методов введения без конкретных ограничений могут использоваться разнообразные способы, обычно осуществляемые в данной области, такие как липофекция, электропорация и кальций-фосфатный метод. Более конкретно, это может быть осуществлено, как описано в публикациях Cancer Res 56: 5672-7, 1996; J Immunol 161: 5607-13, 1998; J Exp Med 184: 465-72, 1996; опубликованном Японском переводе международной заявки 2000-509281. При переносе гена в клетки APC ген подвергается транскрипции, трансляции и другим процессам в клетке, и затем полученный белок процессируется МНС класса I или класса II, проходит через путь презентации и презентует неполные пептиды.

(5) Цитотоксические Т-клетки

Предполагается, что цитотоксическая Т-клетка, индуцированная против любого пептида Foxp3 по настоящему изобретению, укрепляет иммунную систему, регулируя клетки T-reg *in vivo*, и, таким образом, может использоваться в качестве вакцин подобно пептидам. Таким образом, настоящее изобретение относится к выделенным цитотоксическим Т-клеткам, которые индуцируются с помощью любого пептида по настоящему изобретению.

Такие цитотоксические Т-клетки могут быть получены путем (1) введения индивиду или (2) контактирования (стимулирования) полученных от индивида клеток APC, CD8-положительных клеток или моноклеарных лейкоцитов периферической крови *in vitro* с пептидом по настоящему изобретению.

Цитотоксические Т-клетки, которые были индуцированы путем стимулирования из клеток APC, которые презентуют на своей поверхности пептиды по настоящему изобретению, могут быть получены от индивидов, являющихся мишенями для лечения и/или профилактики заболевания, и могут вводиться индивидуально или в сочетании с другими лекарственными средствами, включающими пептиды по настоящему изобретению или экзосомы, с целью получения эффектов регуляции. Полученные цитотоксические Т-клетки действуют специфично против клеток-мишеней, презентующих пептиды по настоящему изобретению, например такие же пептиды, которые используются для индукции. Клетки-мишени могут представлять собой клетки, которые эндогенно экспрессируют Foxp3, или клетки, которые трансфецированы генами Foxp3, и клетки, которые презентуют на своей поверхности пептиды по настоящему изобретению и благодаря стимулированию этими пептидами могут также становиться мишенями для атаки.

(6) TCR

Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды, которые способны к формированию субъединицы Т-клеточного рецептора (TCR), и к способам ее применения.

Субъединицы TCR обладают способностью образовывать TCR, которые придают специфичность в отношении Т-клеток для клеток, презентующих пептид по настоящему изобретению. Нуклеиновые кислоты альфа- и бета-цепи в качестве субъединиц TCR клеток CTL, индуцированных с помощью одного или нескольких пептидов по настоящему изобретению, могут быть идентифицированы способом, известным в данной области (WO2007/032255 и Morgan et al., J Immunol, 171, 3288 (2003)). Производные TCR предпочтительно связываются с клетками-мишенями, презентующими пептид Foxp3 с высокой авидностью, и необязательно опосредуют эффективное уничтожение клеток-мишеней, презентующих пептид Foxp3 *in vivo* и *in vitro*.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие субъединицы TCR, могут быть введены в подходящие векторы, например ретровирусные векторы. Эти векторы хорошо известны в данной области. Нуклеиновые кислоты или векторы, включающие их, могут эффективно переноситься в Т-клетку, которая предпочтительно представляет собой Т-клетку пациента. Преимущественно изобретение относится к готовой композиции, позволяющей быструю модификацию собственных Т-клеток пациента (или Т-клеток другого млекопитающего) для быстрого и легкого получения модифицированных Т-клеток, обладающих превосходными свойствами уничтожения клеток Т-reg.

Также настоящее изобретение относится к клеткам CTL, которые получают путем трансдукции с помощью нуклеиновых кислот, кодирующих полипептидные субъединицы TCR, связывающиеся с пептидом Foxp3 по настоящему изобретению. Трансдуцированные клетки CTL способны к образованию комплекса с клетками Т-reg *in vivo* и культивируются с помощью хорошо известного метода культивирования *in vitro* (например, Kawakami et al., J Immunol., 142, 3452-3461 (1989)). Т-клетки по изобретению могут использоваться для образования иммуногенной композиции, используемой для лечения или профилактики рака у пациента, нуждающегося в терапии или в повышении иммунитета (WO2006/031221).

VI. Способы применения пептидов Foxp3

Пептиды Foxp3 по настоящему изобретению и полинуклеотиды, кодирующие пептиды Foxp3, могут использоваться для индукции клеток APC и CTL. Пептиды Foxp3

и полинуклеотиды могут использоваться в сочетании с любыми другими соединениями, при условии, что соединения не ингибируют их способность индуцировать клетки CTL. Таким образом, любые из вышеуказанных фармацевтических средств по настоящему изобретению могут использоваться в

(1) Способы индукции антиген-презентирующих клеток (APC)

Таким образом, настоящее изобретение относится к способам индукции клеток APC с использованием пептидов по настоящему изобретению или полинуклеотидов, кодирующих эти пептиды. Индукция клеток APC может осуществляться, как описано выше, в параграфе "V-(4) Антиген-презентирующие клетки". Настоящее изобретение также относится к способу индукции клеток APC, способных на высоком уровне к индукции цитотоксических Т-клеток, индукция которых описана выше в параграфе "V-(4) Антиген-презентирующие клетки". Альтернативно, настоящее изобретение относится к применению пептидов Foxp3, выбранных из пептидов, содержащих аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3-5, 7-9, 12, 15-19, 22, 24, 27-30, 37, 67 или 74, или полинуклеотидов, кодирующих пептиды Foxp3, для получения фармацевтической композиции, содержащей антиген-презентирующие клетки. Кроме того, настоящее изобретение относится к пептидам Foxp3, выбранным из пептидов, содержащих аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3-5, 7-9, 12, 15-19, 22, 24, 27-30, 37, 67 или 74, или полинуклеотидам, кодирующим пептиды Foxp3, для индукции антиген-презентирующих клеток.

(2) Способы индукции цитотоксических Т-клеток

Кроме того, настоящее изобретение относится к способам индукции клеток CTL с использованием пептидов Foxp3 по настоящему изобретению или полинуклеотидов, кодирующих пептиды Foxp3. Когда пептиды Foxp3 по настоящему изобретению вводят индивиду, клетки CTL индуцируются в организме индивида и повышается сила иммунной системы, регулирующей клетки T-reg. Альтернативно, способы индукции могут использоваться для ex vivo-терапевтического способа, в котором полученные у индивида APC и CD8-положительные клетки или мононуклеарные лейкоциты периферической крови контактируют (стимулируются) in vitro с пептидами по настоящему изобретению, и после индукции клеток CTL клетки возвращают индивиду. Например, способ может включать стадии: а) забора клеток APC у индивида; б) контактирования клеток APC стадии а) с пептидом; в) смешивания клеток APC стадии б) с CD8+ Т-клетками и совместного культивирования для индукции цитотоксических Т-клеток и д) забора CD8+ Т-клеток из совместной культуры стадии в).

CD8+ Т-клетки, обладающие цитотоксической активностью, полученные на стадии д), могут вводиться индивиду в качестве вакцины. Клетки APC, которые следует смешивать с CD8+ Т-клетками на описанной выше стадии в), также могут быть получены путем переноса генов, кодирующих пептиды по настоящему изобретению, в клетки APC, как подробно описано выше в параграфе "V-(4) Антиген-презентирующие клетки"; но ими не ограничены, и любые клетки APC или экзосома, которые эффективно презентуют пептиды по настоящему изобретению Т-клеткам, могут использоваться в соответствии с настоящим способом. Альтернативно, настоящее изобретение относится к использованию пептидов Foxp3, выбранных из пептидов, содержащих аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3-5, 7-9, 12, 15-19, 22, 24, 27-30, 37, 67 или 74, или полинуклеотидов, кодирующих пептиды Foxp3, для получения фармацевтической композиции, содержащей клетки CTL. Кроме того,

настоящее изобретение также относится к пептидам Foxp3, выбранным из пептидов, содержащих аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3-5, 7-9, 12, 15-19, 22, 24, 27-30, 37, 67 или 74, или полинуклеотидам, кодирующим пептиды Foxp3, для индукции клеток CTL.

(3) Регуляция иммуносупрессии

Как обсуждалось выше, пептиды, полинуклеотиды, экзосомы, APC и CTL по настоящему изобретению могут использоваться в качестве вакцин для регуляции (т.е. подавления) клеток T-reg. На основании предположения о том, что клетки T-reg являются одним из главных игроков, участвующих в подавлении разнообразных типов иммунного ответа, конкретно цитотоксической активности клеток CTL, способность пептидов, полинуклеотидов, экзосом, клеток APC и CTL по настоящему изобретению указывает на то, что они также могут использоваться для противодействия иммуносупрессии, конкретно, цитотоксической активности клеток CTL. Соответственно, настоящее изобретение относится к способу регуляции клеток T-reg, а также к способу регуляции (т.е. противодействия) иммуносупрессии, включающим стадии введения нуждающемуся в этом индивиду пептидов, полинуклеотидов, экзосом, клеток APC или CTL по настоящему изобретению. Кроме того, настоящее изобретение также относится к применению пептидов Foxp3, выбранных из пептидов, содержащих аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3-5, 7-9, 12, 15-19, 22, 24, 27-30, 37, 67 или 74, или полинуклеотидов, кодирующих пептиды Foxp3, для получения иммуногенной композиции, предназначенной для регуляции иммуносупрессии. Альтернативно, настоящее изобретение также относится к пептидам Foxp3, выбранным из пептидов, содержащих аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3-5, 7-9, 12, 15-19, 22, 24, 27-30, 37, 67 или 74, или к полинуклеотидам, кодирующим пептиды Foxp3, предназначенным для регуляции иммуносупрессии.

В данном случае регуляция иммуносупрессии означает, что введение пептидов, полинуклеотидов, экзосом, клеток APC или CTL по настоящему изобретению вызывает любой тип изменения *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления изменение, вызванное введением пептидов, полинуклеотидов, экзосом, клеток APC или CTL по настоящему изобретению, представляет собой уменьшение уровня иммуносупрессивного состояния (подавление или противодействие иммуносупрессии), а именно индукцию антииммуносупрессии. Таким образом, настоящее изобретение также относится к способу индукции антииммуносупрессии, причем указанный способ включает стадии введения нуждающемуся в этом индивиду пептидов, полинуклеотидов, экзосом, клеток APC или CTL по настоящему изобретению. В целом, антииммуносупрессия включает иммунные ответы, такие как:

- индукция цитотоксических Т-лимфоцитов против клеток T-reg, экспрессирующих Foxp3,
- индукция антител, которые распознают клетки T-reg, экспрессирующие Foxp3, и
- индукция продукции анти-T reg цитокинов.

Таким образом, если определенный белок индуцирует любой иммунный ответ при инокуляции животному, то считается, что белок обладает эффектом индукции антииммуносупрессии. Индукция белком антииммуносупрессии может определяться с помощью наблюдения *in vivo* или *in vitro* ответа иммунной системы организма-хозяина против белка.

Например, хорошо известен способ определения индукции (т.е. активации) цитотоксических Т-лимфоцитов. Конкретно, известно, что чужеродное вещество,

которое попадает в живой организм, презентуется Т- или В-клеткам с помощью антиген-презентирующих клеток (АРС). Т-клетки, которые отвечают за антиген, презентуемых АРС, дифференцируются в цитотоксические Т-клетки антиген-специфичным образом (или цитотоксические Т-лимфоциты; CTL) благодаря
 5 стимулированию антигеном, и затем пролиферируют (этим обозначается активация Т-клеток). Таким образом, индукция клеток CTL с помощью определенного пептида может оцениваться путем презентации пептида Т-клетке с помощью АРС и с помощью детекции индукции (т.е. пролиферации, продукции IFN- γ и цитотоксической
 10 активности) клеток CTL. Кроме того, клетки АРС обладают эффектом активации CD4+ Т-клеток, CD8+ Т-клеток, макрофагов, эозинофилов и NK-клеток. Так как CD4+ Т-клетки также являются важными в процессе противоопухолевого иммунитета, функция пептида как индуктора противоопухолевого иммунитета может оцениваться с использованием в качестве показателя эффекта активации этих клеток.

15 Способ оценки функции, определяющей способность индуцировать клетки CTL с использованием дендритных клеток (DC) в качестве АРС, хорошо известен в данной области. Согласно этому способу тестируемый пептид сначала контактирует с DC и затем DC контактирует с Т-клетками. Обнаружение Т-клеток, обладающих
 20 цитотоксическими эффектами в отношении клеток, экспрессирующих (т.е. презентируемых на HLA-молекуле) представляющий интерес пептид, после контактирования с клетками DC, демонстрирует, что тестируемый пептид обладает активностью индуцировать цитотоксические Т-клетки. Активность клеток CTL в отношении клеток Т-reg может обнаруживаться, например, с использованием в
 25 качестве показателя лизиса опухолевых клеток, меченных ^{51}Cr . Альтернативно, также хорошо известен и может использоваться в настоящем изобретении способ оценки степени разрушения клеток Т-reg с использованием в качестве показателя активности поглощения ^3H -тимидина или высвобождения LDH (лактозодегидрогеназы).

30 Кроме клеток DC, в качестве АРС также могут использоваться мононуклеарные клетки периферической крови. Сообщалось, что индукция клеток CTL повышается при культивировании РВМС в присутствии GM-CSF и IL-4. Подобным образом, было показано, что клетки CTL индуцируются при культивировании РВМС в присутствии
 35 гемоцианина лимфы улитки (KLH) и IL-7.

С помощью этих способов было подтверждено, что тестируемые пептиды, обладающие активностью индуцировать клетки CTL, представляют собой пептиды, обладающие эффектом активации клеток DC и последующей активностью индукции
 40 клеток CTL. Таким образом, пептиды Foxp3, которые индуцируют клетки CTL в отношении опухолевых клеток, могут быть использованы в качестве вакцин против клеток Т-reg. Кроме того, клетки АРС, которые приобретают способность индуцировать клетки CTL против клеток Т-reg при контактировании с пептидами Foxp3, также могут использоваться в качестве вакцин против клеток Т-reg.
 45 Кроме того, клетки CTL, которые приобретают цитотоксичность благодаря презентации пептидных антигенов клетками АРС, также могут использоваться в качестве вакцин против клеток Т-reg. Такие способы регуляции клеток Т-reg с использованием иммунитета, вызванного клетками АРС и CTL, обозначаются как клеточная иммунотерапия и охватываются настоящим изобретением.

50 Как правило, известно, что при использовании полипептида для клеточной иммунотерапии эффективность индукции клеток CTL увеличивается при комбинировании множества пептидов, имеющих различные структуры, и их контактировании с клетками DC. Таким образом, при стимулировании клеток DC

фрагментами белка, преимущественно используется смесь фрагментов множества типов белков.

Альтернативно, индукция антииммуносупрессии с помощью пептида может быть подтверждена с помощью наблюдения индукции процесса продукции антител против клеток T-reg. Например, когда у индивида, например пациента-человека, лабораторного животного, иммунизированного с помощью пептида, индуцируются антитела против пептида и когда клетки T-reg подавляются с помощью этих антител, то пептид может определяться по его способности индуцировать антииммуносупрессию.

Антииммуносупрессия индуцируется путем введения вакцины по настоящему изобретению, и индукция обеспечивает подавление иммуносупрессии. Такие эффекты могут быть статистически значимыми. Например, из наблюдения, при уровне значимости, составляющем 5% или менее, эффект регуляции вакцины против клеток T-reg сравним с контролем, где отсутствовало введение вакцины. Например, для статистического анализа могут использоваться тест Стюдента, U-критерий Манна Уитни или ANOVA.

При использовании в качестве вакцины клеток APC или CTL по настоящему изобретению могут регулироваться клетки T-reg (т.е. подавляться), например, методом *ex vivo*. Более конкретно, клетки PBMC индивида, получающего лечение или которому необходима профилактика заболевания, собирают, приводят клетки *ex vivo* в контакт с полипептидом, и после индукции клеток APC или CTL могут вводиться индивиду. Клетки APC также могут индуцироваться введением вектора, кодирующего полипептид, в клетки PBMC *ex vivo*. Клетки APC или CTL, индуцированные *in vitro*, могут быть клонированы перед введением. С помощью клонирования и роста клеток, обладающих активностью разрушать клетки-мишени, клеточная иммунотерапия может осуществляться более эффективно. Кроме того, клетки APC и CTL, выделенные таким способом, могут использоваться для клеточной иммунотерапии не только против заболеваний индивидов, от которых клетки были получены, но также против подобных типов заболеваний у других индивидов.

Если не указано иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют такое же значение, как общепринято для любого специалиста в данной области, к которой относится настоящее изобретение. Хотя материалы и способы, подобные или эквивалентные описанным в настоящем описании, могут использоваться при практическом применении или при тестировании настоящего изобретения, подходящие материалы и способы описаны ниже. Все публикации, патентные заявки, патенты и другая литература, приведенная в настоящем описании, включена в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте. В случае разночтения настоящее описание, в том числе определения, следует рассматривать как приоритетное. Кроме того, материалы, способы и примеры являются исключительно иллюстративными и не предназначены для ограничения изобретения.

Приведенные ниже примеры представлены для иллюстрации настоящего изобретения и оказания помощи любому специалисту в получении и использовании таких же результатов. Примеры никоим образом не предназначены для ограничения объема изобретения.

Примеры

Материалы и способы

Клеточные линии

Клетки A24LCL (HLA-A24/24), клетки T2 (HLA-A02/02), В-лимфобластные клетки человека, 293Т и COS7 были получены из ATCC.

Селекция возможных пептидов, полученных из Foxp3

Структура 9-мерного и 10-мерного пептидов, полученных из Foxp3, которые связываются с молекулами HLA-A*2402 и HLA-A*0201, были спрогнозированы с использованием программного обеспечения для прогноза связывания "BIMAS" (http://bimas.dcrt.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform), алгоритмы которого описаны Parker KC, et al. ((1994) J Immunol.; 152(1):163-75) и Kuzushima K, et al. ((2001) Blood.; 98(6):1872-81). Эти пептиды синтезировали с помощью Sigma (Sapporo, Japan) согласно стандартному методу твердофазного синтеза и очищали ВЭЖХ с обращенной фазой. Чистоту (>90%) и идентичность пептидов определяли аналитическим анализом ВЭЖХ и анализом масс-спектрометрии соответственно. Пептиды растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) в концентрации 20 мг/мл и хранили при -80°C.

In vitro индукция клеток CTL

Выделенные из моноцитов дендритные клетки (DC) получали как антиген-презентирующие клетки (APC) для индукции ответа CTL в отношении пептидов, презентированных на HLA. DC генерировали in vitro, как описано в других источниках (Horiguchi S. et al. Cancer Res. 59:2950-6). Конкретно, мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), взятые у здорового добровольца (HLA-A*2402 и/или HLA-A*0201), с помощью Ficoll-Plaque (Pharmacia) разделяли с помощью адгезии на пластиковую чашку Петри (Becton Dickinson) для обогащения фракцией моноцитов. Обогащенную моноцитами популяцию культивировали в присутствии 1000 Ед/мл GM-CSF (R&D System) и 1000 Ед/мл IL-4 (R&D System) в среде AIM-V (Invitrogen), содержащей 2% инактивированную нагреванием аутологичную сыворотку (AS). Через 7 дней культивирования клетки DC, продуцируемые цитокинами, стимулировали синтезированными пептидами 20 мкг/мл в присутствии 3 мкг/мл бета-2-микроглобулина в течение 4 часов при 20°C в среде AIM-V. Стимулированные пептидом клетки DC затем инактивировали с помощью митомицина С (MMC) (30 мкг/мл в течение 30 мин) и смешивали в соотношении 1:20 с аутологичными CD8+ Т-клетками, полученными положительной селекцией с использованием набора реагентов для выделения CD8-положительных клеток (Dyna). Полученные культуры помещали в 48-луночные планшеты (Corning); каждая лунка содержала $1,5 \times 10^4$ стимулированных пептидом клеток DC, 3×10^5 CD8+ Т-клеток и 10 нг/мл IL-7 (R&D System) в 0,5 мл среды AIM-V/2% AS. Через три дня к культурам добавляли IL-2 (CHIRON) до конечной концентрации 20 МЕ/мл. На 7 и 14 день Т-клетки дополнительно повторно стимулировали пептидом аутологичных клеток DC. Клетки DC получали каждый раз по аналогичной методике, как описано выше. Активность CTL тестировали в отношении стимулированных пептидом клеток A24LCL или клеток T2 на 21 день после третьего раунда пептидного стимулирования.

Методика размножения клеток CTL

Количество клеток CTL увеличивали за счет их деления в культуре с применением способа, как описано в публикации Riddell, et al. (Walter et al., N Engl J Med 333(16): 1038-44, 1995; Riddell et al., Nat Med 2(2): 216-23, 1996 Feb). Клетки CTL в количестве 5×10^4 ресуспендировали в 25 мл AIM-V/5% AS вместе с двумя типами В-лимфобластных клеточных линий человека, инактивированных с помощью MMC, в присутствии 40 нг/мл моноклонального антитела к CD3 (Pharmingen). Через один день после инициирования культур к ним добавляли 120 МЕ/мл IL-2. В культурах меняли

среду на свежую AIM-V/5% AS, содержащую 30 МЕ/мл IL-2 на 5, 8 и 11 день.

Специфичная активность клеток CTL

Для определения специфичной активности клеток CTL осуществляли анализ IFN- γ -ELISPOT и анализ IFN- γ -ELISA. Коротко, стимулированные пептидом клетки A24-LCL, T2 (1×10^4 /лунка) или клетки, эндогенно экспрессирующие Foxp3 и молекулу HLA, получали в качестве стимулирующих клеток. Культивированные в 48-луночных планшетах клеточные линии CTL использовали в качестве клеток-респондеров. Анализ IFN- γ -ELISPOT и анализ IFN- γ -ELISA осуществляли согласно рекомендациям производителя.

Иммуногенность пептидов эпитопа у мышей BALB/c

Для индукции пептидо-специфичных клеток CTL иммунизацию проводили с использованием 100 мкл вакцинной смеси, которая содержала 50 мкл рестриктированного пептида HLA-A24 и 50 мкл IFA на мышь. Вакцину вводили подкожно в правый бок мышей для первой иммунизации в день 0 и в левый бок для второй иммунизации на 7 день. На 14 день спленоциты вакцинированных мышей использовали в качестве клеток-респондеров и клетки RLmale1, стимулированные пептидом или без него, использовали в качестве стимулятора клеток для анализа IFN- γ -ELISPOT.

In vivo противоопухолевые эффекты

Клетки 4T1 (1×10^5 на мышь) вводили подкожно в правый бок мышей BALB/c в день 0. Вакцинацию проводили на 3 и 10 день с использованием hFoxp3-252 (KLSAMQAHN: SEQ ID NO:17) или mFoxp3-252 (KLGAMQAHN: SEQ ID NO:88) конъюгированных пептидов IFA.

Анализ на аффинность пептида Foxp3-9-252, содержащего замену, в отношении молекулы HLA

Анализ IFN- γ -ELISA осуществляли для определения аффинности пептида, содержащего замену, в отношении молекулы HLA-A2. Клетки CTL, индуцированные с помощью пептида Foxp3-9-252-WT (KLSAMQAHN: SEQ ID NO:17), использовали в качестве клеток-респондеров и клетки T2 получали в качестве стимулятора клеток путем инкубирования в присутствии пептида Foxp3-9-252-WT, Foxp3-9-252-9V (KLSAMQAHN: SEQ ID NO:95) и HIV-A02 (SLYNTYATL) при 37°C в течение 2 часов. Стимулирование пептидом клеток T2 осуществляли в широком интервале концентраций каждого пептида (10 - 10^{-4} мкг/мл).

Результаты

Прогнозирование результатов HLA-A24- и HLA-A2-связывающих пептидов, полученных из Foxp3

В таблицах 1, 2 и 3 показаны HLA-A*2402-связывающие пептиды или HLA-A*0201-связывающие пептиды Foxp3-белка для бальной оценки высокого прогнозирования аффинности связывания. В общем выбирали 60 пептидов с потенциальной активностью связывания HLA-A24 и 26 пептидов с потенциальной активностью связывания HLA-A2.

Таблица 1 HLA-A2402-связывающие 9-мерные пептиды, полученные из Foxp3				
	Стартовое положение	Последовательность	Бальная оценка	SEQ ID NO
Foxp3-A24-9мер	363	IYHWFTRMF	100	3
	207	VFEEPEDFL	36	4
	332	KFHNMRPPF	20	5
	323	EFLHNMDYF	15	6

5		366	WFTRMFAFF	12	7
		337	RPPFTYATL	12	8
		190	SYPLLANGV	10,8	9
		27	RAAPKASDL	9,6	39
		238	MVQSLEQQL	8,64	40
10		87	GPLPHLQAL	8,64	41
		252	KLSAMQ AHL	8	17
		8	KPSAPSLAL	8	42
		352	EAPKQRTL	7,2	43
		240	QSLEQQLVL	12	44
15		245	QLVLEKEKL	6,6	45
		403	GAVWTVDEL	6,6	46
		185	AVPQSSYPL	6	47
		28	AAPKASDLL	6	48
		141	FSLKARPGL	6	49
20		383	NAIRHNLSL	6	50
		186	VPQSSYPLL	6	51
		343	ATLIRWAIL	6	52
		200	KWPGCEKVF	6	53
		68	QLQLPTLPL	6	54
25		341	TYATLIRWA	6	55
		115	TPVLQVHPL	6	56
		61	LNPMPSSL	6	57
		159	EWVSREPAL	6	58
		175	SAPRKDSTL	6	59
30		234	LQREMVQSL	5,76	60
		304	SLFAVRRHL	5,6	61
		359	TLNEIYHWF	5,04	62
Стартовое положение означает номер аминокислоты с N-конца Фоxp3. Бальную оценку связывания получают с помощью программы "BIMAS", описанной в разделе «Материалы и способы».					

Таблица 2 HLA-A2402-связывающие 10-мерные пептиды, полученные из Фоxp3				
	Стартовое положение	Последовательность	Бальная оценка	SEQ ID NO
35	Фоxp3-A24-10мер	341	TYATLIRWAI	70
		140	VFSLKARPGL	20
		114	RTPVLQVHPL	12
		27	RAAPKASDLL	9,6
		206	KVFEePEDFL	9,6
40		402	KGAVwTVDEL	8,8
		237	EMVQsLEQQL	8,64
		87	GPLPhLQALL	8,64
		303	DSLFaVRRHL	8,4
		358	RTLNeIYHWF	8,4
45		5	RPGKpSAPSL	8
		382	KNAIrHNLSL	8
		190	SYPLIANGVC	7,5
		86	LGPLpHLQAL	7,2
		60	SLNPmPPSSL	12
50		184	SAVPqSSYPL	7,2
		62	NPMPpSQLQL	12
		233	LLQReMVQSL	12
		244	QQLVIEKEKL	6,6
		185	AVPQsSYPLL	6
55		149	LPPGiNVASL	6
		296	SGPReAPDSL	6
		77	VMVApSGARL	6

	159	EWVStEPALL	6	83
	67	SQLQIPTLPL	6	84
	316	HGNSIfPEFL	6	85
	380	TWKNaIRHNL	5,6	86
	363	IYHWfTRMFA	5	87
Стартовое положение означает номер аминокислоты с N-конца Foxp3. Бальную оценку связывания получают с помощью программы "BIMAS", описанной в разделе «Материалы и способы».				

Таблица 3 HLA-A0201-связывающие 10-мерные пептиды, полученные из Foxp3				
	Стартовое положение	Последовательность	Бальная оценка	SEQ ID NO
10	Foxp3-A2-9мер	388	NLSLHKCFV	382,536
		95	LLQDRPHFM	190,448
		390	SLHKCFVRV	132,149
		69	LQLPTLPLV	102,018
15		252	KLSAMQAHL	74,768
		68	QLQLPTLPL	21,362
		304	SLFAVRRHL	15,808
		239	VQSLEQQLV	11,988
20		245	QLVLEKEKL	10,468
	Foxp3-A2-10мер	359	TLNEIYHWFT	1260,32
		206	KVFEEDFL	267,467
		263	KMALTKASSV	175,812
25		70	QLPTLPLVMV	159,97
		68	QLQLPTLPLV	159,97
		94	ALLQDRPHFM	101,099
		233	LLQREMVQSL	83,527
30		152	GINVASLEWV	59,279
		77	VMVAPSGARL	26228
		60	SLNPMPPSQL	21,362
		299	REAPDSLFAV	18,041
35		252	KLSAMQAHLA	17,388
		102	FMHQLSTVDA	16,505
		223	LLDEKGRAQC	13,851
		344	TLIRWAILEA	11,426
		246	LVLEKEKLSA	11,21
		238	MVQSLEQQLV	10,346
Стартовое положение означает номер аминокислоты с N-конца Foxp3. Бальную оценку связывания получают с помощью программы "BIMAS", описанной в разделе «Материалы и способы».				

Стимулирование Т-клеток с использованием пептидов с прогнозируемой структурой, рестриктированных по HLA-A2402

Согласно методу, описанному выше в разделе «Материалы и способы», получали клетки CTL с использованием пептидов, полученных из Foxp3-белка. Полученные в результате клетки CTL, проявляющие с помощью анализа IFN- γ -ELISPOT определяемую специфичную активность CTL, показаны на фиг.1А и фиг.1В. На фиг.1А, клетки в лунке под номером #2 и 7, стимулированные Foxp3-A24-9-363, #1 и #6, стимулированные Foxp3-A24-9-366, #5, стимулированные Foxp3-A24-9-190, #7, стимулированные Foxp3-A24-10-87 и Foxp3-A24-10-60, продемонстрировали эффективное продуцирование IFN- γ по сравнению с контролем. На фиг.1В, клетки в лунке под номером #4, стимулированные Foxp3-A24-9-207, #6, стимулированные Foxp3-A24-9-332, #6, стимулированные Foxp3-A24-9-337, и #1, стимулированные Foxp3-A24-10-114, продемонстрировали эффективное продуцирование IFN- γ по сравнению с контролем.

Стимулирование Т-клеток с использованием пептидов с прогнозируемой структурой, рестриктивных по HLA-A0201

Полученные в результате клетки CTL, проявляющие при осуществлении анализа IFN-γ-ELISPOT определяемую специфичную активность CTL, показаны на 5
фиг.2А, фиг.2В и фиг.2С. На фиг.2А, клетки в лунке под номером #2, стимулированные Foxp3-A2-9-390, #2 с помощью Foxp3-A2-9-69, #6, стимулированные Foxp3-A2-9-252, #4, стимулированные Foxp3-A2-10-359, #7, стимулированные Foxp3-A2-263, и #2 и #5, стимулированные Foxp3-A2-10-94, 10
продemonстрировали эффективное продуцирование IFN-γ по сравнению с контролем. На фиг.2В, клетки во всех лунках, стимулированные Foxp3-A2-10-233, в лунках с номерами #6 и #7, стимулированные Foxp3-A2-10-152, #5, стимулированные Foxp3-A2-10-77, и #1, стимулированные Foxp3-A2-10-246 и Foxp3-A2-10-94, продемонстрировали эффективное продуцирование IFN-γ по сравнению с контролем. На фиг.2С, клетки в 15
лунках с номерами #1, #2, #4, #5, #7, #9, #11 и #12, стимулированные Foxp3-A2-9-390, #5 и #11, стимулированные Foxp3-A2-9-304, #7, стимулированные Foxp3-A2-9-68, и #12, стимулированные Foxp3-A2-9-252, продемонстрировали эффективное продуцирование IFN-γ по сравнению с контролем.

Создание клеточных линий CTL из специфичных пептидов Foxp3

Количество клеток в положительных лунках увеличивали за счет их деления и осуществляли анализ IFN-γ-ELISA. На фиг.3А, В и С, клеточные линии CTL, стимулированные Foxp3-A02-9-390 (SEQ ID NO:15), продемонстрировали эффективное 25
продуцирование IFN-γ по сравнению с контролем. На фиг.3D, клеточные линии CTL, стимулированные Foxp3-A02-9-252 (SEQ ID NO:17), продемонстрировали эффективное продуцирование IFN-γ по сравнению с контролем. На фиг.3Е клеточные линии CTL, стимулированные Foxp3-A24-10-60 (SEQ ID NO:74), продемонстрировали эффективное продуцирование IFN-γ по сравнению с контролем. На фиг.3F клеточные линии CTL, 30
стимулированные Foxp3-A02-10-94 (SEQ ID NO:27), продемонстрировали эффективное продуцирование IFN-γ по сравнению с контролем. На фиг.3G клеточные линии CTL, стимулированные Foxp3-A24-10-87 (SEQ ID NO:68), продемонстрировали эффективное продуцирование IFN-γ по сравнению с контролем.

Специфичная активность CTL против клеток-мишеней, эндогенно экспрессирующих Foxp3 и HLA-A*2402 или HLA-A*0201

Созданные клоны CTL, индуцированных против этих пептидов, исследовали на способность распознавать клетки-мишени, эндогенно экспрессирующие Foxp3 и HLA-A*24 или 02. Специфичную активность CTL против клеток 293Т, трансфицированных 40
одновременно геном Foxp3 и молекулой HLA-A*24 или 02, которые являются специфичной моделью клеток-мишеней, эндогенно экспрессирующих Foxp3 и HLA-A*24 или 02, тестировали с использованием клеточных линий CTL, индуцированных с помощью Foxp3-A02-9-390 (SEQ ID NO:15) и Foxp3-A02-9-252 (SEQ ID NO:17), в качестве эффекторных клеток. На фиг.4А и на фиг.4В, клеточные линии CTL, 45
индуцированные с помощью Foxp3-A02-9-390 (SEQ ID NO:15) и Foxp3-A02-9-252 (SEQ ID NO:17), продемонстрировали высокую специфичную активность клеток CTL против клеток 293Т, которые были трансфицированы одновременно с помощью Foxp3 и HLA-A02. На фиг.4С, клеточные линии CTL, индуцированные с помощью Foxp3-A02-9-252 (SEQ ID NO:17), продемонстрировали высокую специфичную активность 50
клеток CTL против клеток 293Т, которые были трансфицированы одновременно с помощью Foxp3 и HLA-A24. С другой стороны, не продемонстрировано значительной специфичной активности клеток CTL в отношении контролей. Ясно

продемонстрировано, что Foxp3-A02-9-390 и Foxp3-A02-9-252 естественно экспрессировались на поверхности клетки-мишени вместе с молекулой HLA-A02 и/или 24 и распознавались клетками CTL. Кроме того, эти пептиды представляли собой пептиды эпитопов, которые могут использоваться в качестве вакцины, направленной против клеток T-reg, экспрессирующих Foxp3.

Иммуногенность пептида Foxp3-A24-9-252 у мышей BALB/c

Для оценки иммуногенности пептида Foxp3-9-252 у мышей BALB/c осуществляли иммунизацию пептидом Foxp3-9-252 человека (Foxp3-252_h; KLSAMQANL) и пептидом Foxp3-9-252 мыши (Foxp3-252_m; KLGAMQANL) (SEQ ID NO:89) соответственно. После второй инъекции пептида определяли пептидо-специфичную активность клеток CTL с помощью анализа IFN- γ -ELISPOT (фиг.5).

В спленоцитах, собранных от мышей, вакцинированных пептидом, определяли эффективное продуцирование IFN- γ в лунке, где осуществляли совместное культивирование с соответствующими стимулированными пептидом клетками, при этом отсутствовало продуцирование IFN- γ в контрольных лунках. На фиг.5A, у трех из пяти мышей определяли специфичный для пептида Foxp3-252_h ответ клеток CTL (M3, M4 и M5), но не у контрольных мышей (N1-N3), которых вакцинировали только IFA. На фиг.5B, у одной из пяти мышей определяли специфичный для пептида Foxp3-252_m ответ клеток (M1), но не у контрольных мышей (N1-N3), которых вакцинировали только IFA. Эти данные означают, что пептидная вакцинация каждым из пептидов Foxp3-252_h или Foxp3-252_m может индуцировать клетки CTL против стимулированных пептидом клеток-мишеней *in vivo*.

Противоопухолевые эффекты вакцинации пептида эпитопа Foxp3

Для определения противоопухолевых эффектов пептидной вакцинации, регулируемой Foxp3, проводили попытку *in vivo* терапевтической регуляции с использованием опухолевых клеток 4T1 и мышей BALB/c. Клетки рака груди 4T1 вводили подкожно мышам BALB/c в день 0 и затем вакцинацию проводили этим мышам на 3 и 10 день после появления признаков опухоли. В результате рост опухоли видимо уменьшился у мышей BALB/c, вакцинированных пептидами Foxp3-252_h или Foxp3-252_m, по сравнению с контрольными мышами (фиг.6). Что касается статистического анализа, то он показал значительное отличие от подавления опухолевого роста у мышей, вакцинированных с использованием пептидов эпитопа Foxp3.

Аминокислотная замена в пептиде эпитопа Foxp3

В приведенных выше результатах пептид Foxp3-9-252 (SEQ ID NO:17) идентифицируется как пептид эпитопа, рестриктированный одновременно по HLA-A*2402 и HLA-A*0201. Для повышения иммуногенности пептида Foxp3-9-252 выбирали одну или две аминокислотные замены для достижения более высокой аффинности связывания с молекулой HLA-A*2402 или с HLA-A*0201, чем у природного пептида Foxp3-9-252; Foxp3-9-252-WT (KLSAMQANL)(SEQ ID NO:17).

Бальную оценку связывания пептида с аминокислотной заменой Foxp3-9-252 (SEQ ID NO:17) получали с помощью программ BIMAS. В таблице 4 показаны аминокислотные последовательности и бальная оценка связывания с молекулой HLA-A*2402 и 0201 пептида Foxp3-9-252, содержащего аминокислотную замену. Бальную оценку связывания пептида получали с помощью программ BIMAS. Синтезировали, в общем, пятнадцать пептидов, содержащих шесть или девять типов замен, для которых прогнозировали более высокую аффинность связывания с молекулой HLA-A24 или HLA-A2, чем у пептида дикого типа (таблица 4).

Таблица 4

Бальная оценка связывания пептида Foxp3-9-252, содержащего аминокислотную замену, (SEQ ID NO:17) с молекулой HLA-A*2402 или 0201

	Название пептида	Последовательность	Бальная оценка	SEQ ID NO
A2402	Foxp3-9-252	KLSAMQAHL	8,0	17
	2Y	KYSAMQAHL	400,0	89
	2F	KFSAMQAHL	40,0	90
	2Y9I	KYSAMQAHI	100,0	91
	2Y9F	KYSAMQAHF	200,0	92
	2F9I	KFSAMQAHI	10,0	93
	2F9F	KFSAMQAHF	20,0	94
A0201	WT	KLSAMQAHL	74,8	17
	9V	KLSAMQAHV	243,4	95
	3Y	KLYAMQAHL	239,3	96
	3M	KLMAMQAHL	276,6	97
	3L	KLLAMQAHL	276,6	98
	3F	KLFAMQAHL	276,6	99
	3Y9V	KLYAMQAHV	779,0	100
	3M9V	KLMAMQAHV	900,7	101
	3L9V	KLLAMQAHV	900,7	102
	3F9V	KLFAMQAHV	900,7	103

Затем авторы настоящего изобретения определяли, распознаются ли с использованием этих замен клетками CTL, генерированными с помощью пептида Foxp3-9-252-WT, стимуляторы клеток, стимулированных пептидом.

Вследствие этого клетки CTL, индуцированные с помощью пептида Foxp3-9-252-WT, продуцировали IFN-γ против клеток T2, стимулированных пептидом Foxp3-9-252-9V (KLSAMQAHV)(SEQ ID NO:95), подобно клеткам T2, стимулированным пептидом Foxp3-9-252-WT (фиг.7A). Хотя в отсутствие какого-либо пептидного стимулирования не определяли продукции IFN-γ клетками CTL против стимулирующих клеток, это означает, что клетки CTL, генерированные с помощью пептида Foxp3-9-252-WT, могут распознавать презентацию пептида Foxp3-9-252-9V на молекуле HLA-A2, а также пептида Foxp3-9-252-WT.

Кроме того, для оценки, обладает ли пептид Foxp3-9-252-9V более высокой аффинностью в отношении молекулы HLA-A2, чем пептид Foxp3-9-252-WT, активность клеток CTL определяли с использованием стимуляторов клеток, стимулированных этими пептидами, в широком интервале концентраций ($10 \cdot 10^{-4}$ мкг/мл). В результате аналогично продуцировался IFN-γ клетками CTL, культивированными совместно со стимуляторами клеток, стимулированных пептидом Foxp3-9-252-WT или Foxp3-9-252-9V соответственно (фиг.7B). На основании этих данных было показано, что презентация пептида Foxp3-9-252-9V на молекуле HLA-A*0201 может распознаваться клетками CTL, созданными с помощью пептида Foxp3-9-252-WT.

С другой стороны, авторы настоящего изобретения осуществили попытку индукции клеток CTL с использованием всех пептидов, содержащих замены, рестриктированных по HLA-A*0201, включающих пептид Foxp3-9-252-9V. В результате клетки CTL индуцировали с помощью стимулирования пептидом Foxp3-9-252-3M (KLMAMQAHL)(SEQ ID NO:97), Foxp3-9-252-3L (KLLAMQAHL)(SEQ ID NO:98) или пептидом Foxp3-9-252-9V (фиг.7C). Клетки в лунке под номером 3 и 7, стимулированные Foxp3-A02-9-252-3M, в лунке под номером 7, стимулированные Foxp3-A02-9-252-3L, и в лунке под номером 8,

стимулированные Foxp3-A02-9-252-9V, продемонстрировали по сравнению с контролем пептидозависимую продукцию IFN- γ . После создания *in vitro* клеточной линии CTL, индуцированной с помощью стимулирования пептидом Foxp3-9-252-9V, определяли активность клеток CTL с использованием стимулятора клеток, стимулированных пептидом Foxp3-9-252-WT или Foxp3-9-252-9V. Следовательно, клетки CTL, индуцированные с помощью стимулирования пептидом Foxp3-9-252-9V, распознавали стимулирующие клетки, стимулированные пептидом Foxp3-9-252-WT, точно так же, как клетки, стимулированные пептидом Foxp3-9-252-9V (фиг.7D). Эти результаты убедительно показали, что пептид Foxp3-9-252-9V может индуцировать Foxp3-специфичные клетки CTL, так же как пептид Foxp3-9-252-WT.

Анализ гомологии антигенных пептидов

Клетки CTL, стимулированные
 FOXp3-A24-9-363 (SEQ ID NO:3),
 FOXp3-A24-9-366 (SEQ ID NO:7),
 FOXp3-A24-9-190 (SEQ ID NO:9),
 FOXp3-A24-9-207 (SEQ ID NO:4),
 FOXp3-A24-9-332 (SEQ ID NO:5),
 FOXp3-A24-9-337 (SEQ ID NO:8),
 FOXp3-A24-10-114 (SEQ ID NO:12),
 FOXp3-A2-9-390 (SEQ ID NO:15),
 FOXp3-A2-9-69 (SEQ ID NO:16),
 FOXp3-A2-9-252 (SEQ ID NO:17),
 FOXp3-A2-10-359 (SEQ ID NO:22),
 FOXp3-A2-10-263 (SEQ ID NO:24),
 FOXp3-A2-10-94 (SEQ ID NO:27),
 FOXp3-A2-10-233 (SEQ ID NO:28),
 FOXp3-A2-10-152 (SEQ ID NO:29),
 FOXp3-A2-10-77 (SEQ ID NO:30),
 FOXp3-A2-10-246 (SEQ ID NO:37),
 FOXp3-A2-9-68 (SEQ ID NO:18),
 FOXp3-A2-9-304 (SEQ ID NO:19)
 Foxp3-A24-10-87 (SEQ ID NO:67) и
 Foxp3-A24-10-60 (SEQ ID NO:74), продемонстрировали существенную и специфичную активность CTL.

Это означает, что последовательности

FOXp3-A24-9-363 (SEQ ID NO:3),
 FOXp3-A24-9-366 (SEQ ID NO:7),
 FOXp3-A24-9-190 (SEQ ID NO:9),
 FOXp3-A24-9-207 (SEQ ID NO:4),
 FOXp3-A24-9-332 (SEQ ID NO:5),
 FOXp3-A24-9-337 (SEQ ID NO:8),
 FOXp3-A24-10-114 (SEQ ID NO:12),
 FOXp3-A2-9-390 (SEQ ID NO:15),
 FOXp3-A2-9-69 (SEQ ID NO:16),
 FOXp3-A2-9-252 (SEQ ID NO:17),
 FOXp3-A2-10-359 (SEQ ID NO:22),
 FOXp3-A2-10-263 (SEQ ID NO:24),
 FOXp3-A2-10-94 (SEQ ID NO:27),

FOXP3-A2-10-233 (SEQ ID NO:28),
 FOXP3-A2-10-152 (SEQ ID NO:29),
 FOXP3-A2-10-77 (SEQ ID NO:30),
 FOXP3-A2-10-246 (SEQ ID NO:37),
 5 FOXP3-A2-9-68 (SEQ ID NO:18),
 FOXP3-A2-9-304 (SEQ ID NO:19)
 Foxp3-A24-10-87 (SEQ ID NO:67) и

Foxp3-A24-10-60 (SEQ ID NO:74) являются гомологичными пептидам, полученным
 10 из других молекул, о которых известно, что они синтезируются иммунной системой
 человека. Для исключения такой возможности осуществляли анализ на гомологию с
 последовательностями пептидов как запрос с использованием алгоритма BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>) и не обнаружили последовательности,
 обладающей существенной гомологией с данными последовательностями.

15 Полученные результаты показывают, что последовательности

FOXP3-A24-9-363 (SEQ ID NO:3),
 FOXP3-A24-9-366 (SEQ ID NO:7),
 FOXP3-A24-9-190 (SEQ ID NO:9),
 20 FOXP3-A24-9-207 (SEQ ID NO:4),
 FOXP3-A24-9-332 (SEQ ID NO:5),
 FOXP3-A24-9-337 (SEQ ID NO:8),
 FOXP3-A24-10-114 (SEQ ID NO:12),
 FOXP3-A2-9-390 (SEQ ID NO:15),
 25 FOXP3-A2-9-69 (SEQ ID NO:16),
 FOXP3-A2-9-252 (SEQ ID NO:17),
 FOXP3-A2-10-359 (SEQ ID NO:22),
 FOXP3-A2-10-263 (SEQ ID NO:24),
 30 FOXP3-A2-10-94 (SEQ ID NO:27),
 FOXP3-A2-10-233 (SEQ ID NO:28),
 FOXP3-A2-10-152 (SEQ ID NO:29),
 FOXP3-A2-10-77 (SEQ ID NO:30),
 FOXP3-A2-10-246 (SEQ ID NO:37),
 35 FOXP3-A2-9-68 (SEQ ID NO:18),
 FOXP3-A2-9-304 (SEQ ID NO:19)
 Foxp3-A24-10-87 (SEQ ID NO:67) и

Foxp3-A24-10-60 (SEQ ID NO:74) являются уникальными и существует малая
 40 вероятность того, насколько известно авторам, что может быть получен
 непредусмотренный иммунологический ответ на любую другую молекулу.

В заключение, Foxp3 представляет собой антиген, который может быть использован
 для регуляции клеток T-reg, а также вакцины, использующие такие пептиды эпитопов,
 могут быть использованы для иммунотерапии.

45 Обсуждение

Из данных фиг.6 следует, что вакцинация каждым из пептидов hFoxp3-252 и mFoxp3-
 252 может индуцировать эпитоп-специфичный ответ клеток CTL *in vivo*. Это означает,
 что оба пептида эпитопов Foxp3 могут индуцировать клетки CTL против клеток-
 50 мишеней, экспрессирующих Foxp3, и соответствующую молекулу главного комплекса
 гистосовместимости. Другими словами, предполагается, что клетки CTL могут
 распознавать регуляторные Т-лимфоциты (T-reg). Для оценки этой гипотезы
 определяли *in vivo* противоопухолевые эффекты вакцинации с помощью пептидов

эпитопа Foxp3 при использовании мышей BALB/c. Были продемонстрированы очевидные противоопухолевые эффекты у мышей, вакцинированных с помощью пептида hFoxp3-252 и mFoxp3-252 соответственно. Эти результаты убедительно показывают, что опухолевый рост может ингибироваться подавлением клеток T-reg внутри локального микроокружения опухоли даже без вакцинации с использованием любых пептидов эпитопа ТАА. Авторы настоящего изобретения считают, что клетки CTL против опухолевых клеток индуцируются, когда опухоль появляется внутри организма, однако клетки T-reg также индуцируются некоторыми иммуносупрессивными факторами опухолевых клеток и ингибируют функцию противоопухолевых эффекторных клеток. Так как вакцинация с использованием пептида эпитопа Foxp3 может остановить развитие иммуносупрессивного процесса посредством уничтожения или подавления клеток T-reg, противоопухолевые эффекты были продемонстрированы в отсутствие вакцинации с помощью пептида эпитопа ТАА или стимулирования иммунной системы в целом с использованием сильнодействующего адъюванта.

Между прочим, вакцинация с помощью пептида hFoxp3-252 (KLSAMQANHL) (SEQ ID NO:17) может индуцировать клетки CTL и противоопухолевые эффекты в большей степени, чем вакцинация с помощью пептида mFoxp3-252 (KLGAMQANHL) (SEQ ID NO: 88), как показано на фиг.5 и фиг.6. Из этих результатов можно предположить, что с помощью вакцинации с использованием пептида hFoxp3-252 можно эффективно избежать иммунологической толерантности по сравнению с вакцинацией с использованием пептида mFoxp3-252. Другими словами, так как аминокислотная последовательность пептида hFoxp3-252 отличается от аминокислотной последовательности пептида mFoxp3-252 в положении 3, то предполагается, что пептид hFoxp3-252 не является "аутоантигеном" in vivo и может эффективно индуцировать клетки CTL против клеток T-reg.

В заключение, показано, что Foxp3 может служить в качестве новых мишеней для иммунотерапии рака. Кроме того, полученные результаты убедительно поддерживают тот факт, что вакцинация с использованием пептида эпитопа Foxp3 может подавлять функцию клеток T-reg и должна быть доступна для иммунотерапии рака для многих типов раковых клеток.

Формула изобретения

1. Пептид, обладающий способностью индуцировать цитотоксические Т-клетки, где пептид состоит из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:3-5, 7-9, 12, 15-19, 22, 24, 27-30, 37, 67 или 74.

2. Пептид, обладающий способностью индуцировать цитотоксические Т-клетки, где пептид состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:3-5, 7-9, 12, 17, 67 или 74, в которой заменены или добавлены 1 или 2 аминокислот.

3. Пептид по п.2, в котором вторая аминокислота с N-конца аминокислотной последовательности SEQ ID NO:3-5, 7-9, 12, 17, 67 или 74 заменена фенилаланином, тирозином, метионином или триптофаном.

4. Пептид по п.2 или 3, в котором С-концевая аминокислота аминокислотной последовательности SEQ ID NO:3-5, 7-9, 12, 17, 67 или 74 заменена фенилаланином, лейцином, изолейцином, триптофаном или метионином.

5. Пептид, обладающий способностью индуцировать цитотоксические Т-клетки, где пептид состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:15-19, 22, 24, 27-30 или 37, в которой заменены или добавлены 1 или 2 аминокислот.

6. Пептид по п.5, в котором вторая аминокислота с N-конца аминокислотной последовательности SEQ ID NO:15-19, 22, 24, 27-30 или 37 заменена лейцином или метионином.

7. Пептид по п.5 или 6, в котором C-концевая аминокислота аминокислотной последовательности SEQ ID NO:15-19, 22, 24, 27-30 или 37 является валином или лейцином.

8. Пептид по п.2 или 5, причем пептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:95, 97 или 98.

9. Фармацевтическое средство, использующееся для регуляции клеток T-reg, которое содержит 1 или несколько типов пептидов по любому из пп.1-8, которое предназначено для введения индивиду, антиген HLA которого представляет собой HLA-A24 или HLA-A02.

10. Фармацевтическое средство по п.9, использующееся для ингибирования пролиферации клеток T-reg.

11. Фармацевтическое средство по п.9, использующееся для подавления функции клетки T-reg.

12. Фармацевтическое средство по п.9, использующееся для лечения рака.

13. Фармацевтическое средство по п.12, представляющее собой вакцину.

14. Способ индукции антиген-презентирующих клеток, обладающих высокой способностью индуцировать цитотоксические T-клетки, путем введения пептида по любому из пп.1-8.

15. Способ индукции цитотоксических T-клеток путем приведения в контакт антиген-презентирующей клетки с пептидом по любому из пп.1-8 и смешивания антиген-презентирующей клетки с CD8+ T-клетками и совместного культивирования.

16. Выделенная цитотоксическая T-клетка, индуцируемая пептидом по любому из пп.1-8.

17. Выделенная цитотоксическая T-клетка, индуцированная способом по п.15.

18. Антиген-презентирующая клетка, индуцируемая способом по п.14.

19. Способ регуляции клеток T-reg у индивида, включающий введение указанному индивиду вакцины, содержащей пептид по любому из пп.1-8.

20. Применение пептида по любому из пп.1-8 для получения вакцины, использующейся для регуляции клеток T-reg у индивида.

21. Полинуклеотид, кодирующий пептид по любому из пп.1-8.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ОНКТЕРАПИ САЙЕНС, ИНК.

<120> ВАКЦИНА НА ОСНОВЕ ПЕПТИДА FOXR3

<130> ONC-A0620P

<150> US 60/878,615

<151> 2007-01-03

<150> US 60/896,472

<151> 2007-03-22

<160> 103

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 1869

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> кодирующая последовательность ДНК

<222> (189)..(1484)

<400> 1

```

gcacacactc atcgaaaaaa atttggatta ttagaagaga gaggtctgcg gcttccacac      60
cgtacagcgt ggtttttctt ctcggtataa aagcaaagtt gtttttgata cgtgacagtt      120
tcccacaagc caggctgata cttttctgtc agtccacttc accaagcctg cccttggaca      180
aggacccg atg ccc aac ccc agg cct ggc aag ccc tcg gcc cct tcc ttg      230
      Met Pro Asn Pro Arg Pro Gly Lys Pro Ser Ala Pro Ser Leu
      1          5          10
gcc ctt ggc cca tcc cca gga gcc tcg ccc agc tgg agg gct gca ccc      278
Ala Leu Gly Pro Ser Pro Gly Ala Ser Pro Ser Trp Arg Ala Ala Pro
15          20          25          30
aaa gcc tca gac ctg ctg ggg gcc cgg ggc cca ggg gga acc ttc cag      326
Lys Ala Ser Asp Leu Leu Gly Ala Arg Gly Pro Gly Gly Thr Phe Gln
          35          40          45
ggc cga gat ctt cga ggc ggg gcc cat gcc tcc tct tct tcc ttg aac      374
Gly Arg Asp Leu Arg Gly Gly Ala His Ala Ser Ser Ser Ser Leu Asn
          50          55          60
ccc atg cca cca tcg cag ctg cag ctg ccc aca ctg ccc cta gtc atg      422
Pro Met Pro Pro Ser Gln Leu Gln Leu Pro Thr Leu Pro Leu Val Met
          65          70          75
gtg gca ccc tcc ggg gca cgg ctg ggc ccc ttg ccc cac tta cag gca      470
Val Ala Pro Ser Gly Ala Arg Leu Gly Pro Leu Pro His Leu Gln Ala
          80          85          90
ctc ctc cag gac agg cca cat ttc atg cac cag ctc tca acg gtg gat      518
Leu Leu Gln Asp Arg Pro His Phe Met His Gln Leu Ser Thr Val Asp
          95          100          105          110
gcc cac gcc cgg acc cct gtg ctg cag gtg cac ccc ctg gag agc cca      566

```

Ala	His	Ala	Arg	Thr	Pro	Val	Leu	Gln	Val	His	Pro	Leu	Glu	Ser	Pro	
				115					120					125		
gcc	atg	atc	agc	ctc	aca	cca	ccc	acc	acc	gcc	act	ggg	gtc	ttc	tcc	614
Ala	Met	Ile	Ser	Leu	Thr	Pro	Pro	Thr	Thr	Ala	Thr	Gly	Val	Phe	Ser	
			130					135					140			
ctc	aag	gcc	cgg	cct	ggc	ctc	cca	cct	ggg	atc	aac	gtg	gcc	agc	ctg	662
Leu	Lys	Ala	Arg	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Gly	Ile	Asn	Val	Ala	Ser	Leu	
		145					150					155				
gaa	tgg	gtg	tcc	agg	gag	ccg	gca	ctg	ctc	tgc	acc	ttc	cca	aat	ccc	710
Glu	Trp	Val	Ser	Arg	Glu	Pro	Ala	Leu	Leu	Cys	Thr	Phe	Pro	Asn	Pro	
	160					165					170					
agt	gca	ccc	agg	aag	gac	agc	acc	ctt	tgc	gct	gtg	ccc	cag	agc	tcc	758
Ser	Ala	Pro	Arg	Lys	Asp	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	Val	Pro	Gln	Ser	Ser	
175					180					185					190	
tac	cca	ctg	ctg	gca	aat	ggg	gtc	tgc	aag	tgg	ccc	gga	tgt	gag	aag	806
Tyr	Pro	Leu	Leu	Ala	Asn	Gly	Val	Cys	Lys	Trp	Pro	Gly	Cys	Glu	Lys	
				195				200						205		
gtc	ttc	gaa	gag	cca	gag	gac	ttc	ctc	aag	cac	tgc	cag	gcg	gac	cat	854
Val	Phe	Glu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Leu	Lys	His	Cys	Gln	Ala	Asp	His	
			210					215					220			
ctt	ctg	gat	gag	aag	ggc	agg	gca	caa	tgt	ctc	ctc	cag	aga	gag	atg	902
Leu	Leu	Asp	Glu	Lys	Gly	Arg	Ala	Gln	Cys	Leu	Leu	Gln	Arg	Glu	Met	
		225					230					235				
gta	cag	tct	ctg	gag	cag	cag	ctg	gtg	ctg	gag	aag	gag	aag	ctg	agt	950
Val	Gln	Ser	Leu	Glu	Gln	Gln	Leu	Val	Leu	Glu	Lys	Glu	Lys	Leu	Ser	
	240					245					250					
gcc	atg	cag	gcc	cac	ctg	gct	ggg	aaa	atg	gca	ctg	acc	aag	gct	tca	998
Ala	Met	Gln	Ala	His	Leu	Ala	Gly	Lys	Met	Ala	Leu	Thr	Lys	Ala	Ser	
255					260					265					270	
tct	gtg	gca	tca	tcc	gac	aag	ggc	tcc	tgc	tgc	atc	gta	gct	gct	ggc	1046
Ser	Val	Ala	Ser	Ser	Asp	Lys	Gly	Ser	Cys	Cys	Ile	Val	Ala	Ala	Gly	
				275					280					285		
agc	caa	ggc	cct	gtc	gtc	cca	gcc	tgg	tct	ggc	ccc	cgg	gag	gcc	cct	1094
Ser	Gln	Gly	Pro	Val	Val	Pro	Ala	Trp	Ser	Gly	Pro	Arg	Glu	Ala	Pro	
			290					295					300			
gac	agc	ctg	ttt	gct	gtc	cgg	agg	cac	ctg	tgg	ggg	agc	cat	gga	aac	1142
Asp	Ser	Leu	Phe	Ala	Val	Arg	Arg	His	Leu	Trp	Gly	Ser	His	Gly	Asn	
		305					310					315				
agc	aca	ttc	cca	gag	ttc	ctc	cac	aac	atg	gac	tac	ttc	aag	ttc	cac	1190
Ser	Thr	Phe	Pro	Glu	Phe	Leu	His	Asn	Met	Asp	Tyr	Phe	Lys	Phe	His	
	320					325					330					
aac	atg	cga	ccc	cct	ttc	acc	tac	gcc	acg	ctc	atc	cgc	tgg	gcc	atc	1238
Asn	Met	Arg	Pro	Pro	Phe	Thr	Tyr	Ala	Thr	Leu	Ile	Arg	Trp	Ala	Ile	
335					340					345					350	
ctg	gag	gct	cca	gag	aag	cag	cgg	aca	ctc	aat	gag	atc	tac	cac	tgg	1286
Leu	Glu	Ala	Pro	Glu	Lys	Gln	Arg	Thr	Leu	Asn	Glu	Ile	Tyr	His	Trp	
				355				360						365		
ttc	aca	cgc	atg	ttt	gcc	ttc	ttc	aga	aac	cat	cct	gcc	acc	tgg	aag	1334

Phe	Thr	Arg	Met	Phe	Ala	Phe	Phe	Arg	Asn	His	Pro	Ala	Thr	Trp	Lys	
			370					375					380			
aac	gcc	atc	cgc	cac	aac	ctg	agt	ctg	cac	aag	tgc	ttt	gtg	cgg	gtg	1382
Asn	Ala	Ile	Arg	His	Asn	Leu	Ser	Leu	His	Lys	Cys	Phe	Val	Arg	Val	
		385					390				395					
gag	agc	gag	aag	ggg	gct	gtg	tgg	acc	gtg	gat	gag	ctg	gag	ttc	cgc	1430
Glu	Ser	Glu	Lys	Gly	Ala	Val	Trp	Thr	Val	Asp	Glu	Leu	Glu	Phe	Arg	
	400					405					410					
aag	aaa	cgg	agc	cag	agg	ccc	agc	agg	tgt	tcc	aac	cct	aca	cct	ggc	1478
Lys	Lys	Arg	Ser	Gln	Arg	Pro	Ser	Arg	Cys	Ser	Asn	Pro	Thr	Pro	Gly	
415					420				425						430	
ccc	tga	cctcaagatc	aaggaaagga	ggatggacga	acaggggcca	aactggtggg										1534
Pro																
aggcagaggt	ggtgggggca	gggatgatag	gccctggatg	tgcccacagg	gaccaagaag											1594
tgaggtttcc	actgtcttgc	ctgccagggc	ccctgttccc	ccgctggcag	ccacccctc											1654
ccccatcata	tcctttgccc	caaggctgct	cagagggggcc	ccggtcctgg	ccccagcccc											1714
cacctccgcc	ccagacacac	ccccagtcg	agccctgcag	ccaaacagag	ccttcacaac											1774
cagccacaca	gagcctgcct	cagctgctcg	cacagattac	ttcagggctg	gaaaagtcac											1834
acagacacac	aaaatgtcac	aatcctgtcc	ctcac													1869
<210>	2															
<211>	431															
<212>	Белок															
<213>	Homo sapiens															
<400>	2															
Met	Pro	Asn	Pro	Arg	Pro	Gly	Lys	Pro	Ser	Ala	Pro	Ser	Leu	Ala	Leu	
1			5					10					15			
Gly	Pro	Ser	Pro	Gly	Ala	Ser	Pro	Ser	Trp	Arg	Ala	Ala	Pro	Lys	Ala	
			20					25					30			
Ser	Asp	Leu	Leu	Gly	Ala	Arg	Gly	Pro	Gly	Gly	Thr	Phe	Gln	Gly	Arg	
		35					40					45				
Asp	Leu	Arg	Gly	Gly	Ala	His	Ala	Ser	Ser	Ser	Ser	Leu	Asn	Pro	Met	
	50					55					60					
Pro	Pro	Ser	Gln	Leu	Gln	Leu	Pro	Thr	Leu	Pro	Leu	Val	Met	Val	Ala	
65					70					75					80	
Pro	Ser	Gly	Ala	Arg	Leu	Gly	Pro	Leu	Pro	His	Leu	Gln	Ala	Leu	Leu	
				85					90					95		
Gln	Asp	Arg	Pro	His	Phe	Met	His	Gln	Leu	Ser	Thr	Val	Asp	Ala	His	

100										105										110										
Ala	Arg	Thr	Pro	Val	Leu	Gln	Val	His	Pro	Leu	Glu	Ser	Pro	Ala	Met															
			115					120					125																	
Ile	Ser	Leu	Thr	Pro	Pro	Thr	Thr	Ala	Thr	Gly	Val	Phe	Ser	Leu	Lys															
		130					135					140																		
Ala	Arg	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Gly	Ile	Asn	Val	Ala	Ser	Leu	Glu	Trp															
145						150				155					160															
Val	Ser	Arg	Glu	Pro	Ala	Leu	Leu	Cys	Thr	Phe	Pro	Asn	Pro	Ser	Ala															
					165				170					175																
Pro	Arg	Lys	Asp	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	Val	Pro	Gln	Ser	Ser	Tyr	Pro															
			180					185					190																	
Leu	Leu	Ala	Asn	Gly	Val	Cys	Lys	Trp	Pro	Gly	Cys	Glu	Lys	Val	Phe															
		195					200					205																		
Glu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Leu	Lys	His	Cys	Gln	Ala	Asp	His	Leu	Leu															
		210				215					220																			
Asp	Glu	Lys	Gly	Arg	Ala	Gln	Cys	Leu	Leu	Gln	Arg	Glu	Met	Val	Gln															
225					230					235					240															
Ser	Leu	Glu	Gln	Gln	Leu	Val	Leu	Glu	Lys	Glu	Lys	Leu	Ser	Ala	Met															
				245					250					255																
Gln	Ala	His	Leu	Ala	Gly	Lys	Met	Ala	Leu	Thr	Lys	Ala	Ser	Ser	Val															
			260					265					270																	
Ala	Ser	Ser	Asp	Lys	Gly	Ser	Cys	Cys	Ile	Val	Ala	Ala	Gly	Ser	Gln															
		275					280					285																		
Gly	Pro	Val	Val	Pro	Ala	Trp	Ser	Gly	Pro	Arg	Glu	Ala	Pro	Asp	Ser															
		290				295					300																			
Leu	Phe	Ala	Val	Arg	Arg	His	Leu	Trp	Gly	Ser	His	Gly	Asn	Ser	Thr															
305					310					315					320															
Phe	Pro	Glu	Phe	Leu	His	Asn	Met	Asp	Tyr	Phe	Lys	Phe	His	Asn	Met															
				325					330					335																
Arg	Pro	Pro	Phe	Thr	Tyr	Ala	Thr	Leu	Ile	Arg	Trp	Ala	Ile	Leu	Glu															
			340					345					350																	
Ala	Pro	Glu	Lys	Gln	Arg	Thr	Leu	Asn	Glu	Ile	Tyr	His	Trp	Phe	Thr															

355

360

365

Arg Met Phe Ala Phe Phe Arg Asn His Pro Ala Thr Trp Lys Asn Ala
370 375 380

Ile Arg His Asn Leu Ser Leu His Lys Cys Phe Val Arg Val Glu Ser
385 390 395 400

Glu Lys Gly Ala Val Trp Thr Val Asp Glu Leu Glu Phe Arg Lys Lys
405 410 415

Arg Ser Gln Arg Pro Ser Arg Cys Ser Asn Pro Thr Pro Gly Pro
420 425 430

<210> 3
<211> 9
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> пептидная вакцина

<400> 3

Ile Tyr His Trp Phe Thr Arg Met Phe
1 5

<210> 4
<211> 9
<212> белок
<213> Искусственная

<220>
<223> пептидная вакцина

<400> 4

Val Phe Glu Glu Pro Glu Asp Phe Leu
1 5

<210> 5
<211> 9
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> пептидная вакцина

<400> 5

Lys Phe His Asn Met Arg Pro Pro Phe
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> пептидная вакцина

<400> 6

Glu Phe Leu His Asn Met Asp Tyr Phe
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> пептидная вакцина

<400> 7

Trp Phe Thr Arg Met Phe Ala Phe Phe
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> пептидная вакцина

<400> 8

Arg Pro Pro Phe Thr Tyr Ala Thr Leu
1 5

<210> 9

<211> 9

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> пептидная вакцина

<400> 9

Ser Tyr Pro Leu Leu Ala Asn Gly Val
1 5

<210> 10

<211> 10

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> пептидная вакцина

<400> 10

Thr Tyr Ala Thr Leu Ile Arg Trp Ala Ile

1 5 10

<210> 11
<211> 10
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> пептидная вакцина

<400> 11

Val Phe Ser Leu Lys Ala Arg Pro Gly Leu
1 5 10

<210> 12
<211> 10
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> пептидная вакцина

<400> 12

Arg Thr Pro Val Leu Gln Val His Pro Leu
1 5 10

<210> 13
<211> 9
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> пептидная вакцина

<400> 13

Asn Leu Ser Leu His Lys Cys Phe Val
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> пептидная вакцина

<400> 14

Leu Leu Gln Asp Arg Pro His Phe Met
1 5

<210> 15
<211> 9
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина

 <400> 15

 Ser Leu His Lys Cys Phe Val Arg Val
 1 5

<210> 16
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина

 <400> 16

 Leu Gln Leu Pro Thr Leu Pro Leu Val
 1 5

<210> 17
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина

 <400> 17

 Lys Leu Ser Ala Met Gln Ala His Leu
 1 5

<210> 18
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина

 <400> 18

 Gln Leu Gln Leu Pro Thr Leu Pro Leu
 1 5

<210> 19
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина

 <400> 19

 Ser Leu Phe Ala Val Arg Arg His Leu
 1 5

<210> 20
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина

<400> 20

Val Gln Ser Leu Glu Gln Gln Leu Val
 1 5

<210> 21
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина

<400> 21

Gln Leu Val Leu Glu Lys Glu Lys Leu
 1 5

<210> 22
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина

<400> 22

Thr Leu Asn Glu Ile Tyr His Trp Phe Thr
 1 5 10

<210> 23
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина

<400> 23

Lys Val Phe Glu Glu Pro Glu Asp Phe Leu
 1 5 10

<210> 24
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина

<400> 24

Lys	Met	Ala	Leu	Thr	Lys	Ala	Ser	Ser	Val
1				5					10

<210> 25

<211> 10

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> пептидная вакцина

<400> 25

Gln	Leu	Pro	Thr	Leu	Pro	Leu	Val	Met	Val
1				5					10

<210> 26

<211> 10

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> пептидная вакцина

<400> 26

Gln	Leu	Gln	Leu	Pro	Thr	Leu	Pro	Leu	Val
1				5					10

<210> 27

<211> 10

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> пептидная вакцина

<400> 27

Ala	Leu	Leu	Gln	Asp	Arg	Pro	His	Phe	Met
1				5					10

<210> 28

<211> 10

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> пептидная вакцина

<400> 28

Leu	Leu	Gln	Arg	Glu	Met	Val	Gln	Ser	Leu
1				5					10

<210> 29

<211> 10
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина

<400> 29

Gly Ile Asn Val Ala Ser Leu Glu Trp Val
 1 5 10

<210> 30
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина

<400> 30

Val Met Val Ala Pro Ser Gly Ala Arg Leu
 1 5 10

<210> 31
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина

<400> 31

Ser Leu Asn Pro Met Pro Pro Ser Gln Leu
 1 5 10

<210> 32
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина

<400> 32

Arg Glu Ala Pro Asp Ser Leu Phe Ala Val
 1 5 10

<210> 33
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина

<400> 33

Lys Leu Ser Ala Met Gln Ala His Leu Ala
1 5 10

<210> 34
<211> 10
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> пептидная вакцина

<400> 34

Phe Met His Gln Leu Ser Thr Val Asp Ala
1 5 10

<210> 35
<211> 10
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> пептидная вакцина

<400> 35

Leu Leu Asp Glu Lys Gly Arg Ala Gln Cys
1 5 10

<210> 36
<211> 10
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> пептидная вакцина

<400> 36

Thr Leu Ile Arg Trp Ala Ile Leu Glu Ala
1 5 10

<210> 37
<211> 10
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> пептидная вакцина

<400> 37

Leu Val Leu Glu Lys Glu Lys Leu Ser Ala
1 5 10

<210> 38
<211> 10
<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> пептидная вакцина

<400> 38

Met Val Gln Ser Leu Glu Gln Gln Leu Val
1 5 10

<210> 39

<211> 9

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> пептид

<400> 39

Arg Ala Ala Pro Lys Ala Ser Asp Leu
1 5

<210> 40

<211> 9

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> пептидная вакцина

<400> 40

Met Val Gln Ser Leu Glu Gln Gln Leu
1 5

<210> 41

<211> 9

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> пептидная вакцина

<400> 41

Gly Pro Leu Pro His Leu Gln Ala Leu
1 5

<210> 42

<211> 9

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> пептидная вакцина

<400> 42

Lys Pro Ser Ala Pro Ser Leu Ala Leu

1

5

<210> 43
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина

<400> 43

Glu Ala Pro Glu Lys Gln Arg Thr Leu
 1 5

<210> 44
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина

<400> 44

Gln Ser Leu Glu Gln Gln Leu Val Leu
 1 5

<210> 45
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина

<400> 45

Gln Leu Val Leu Glu Lys Glu Lys Leu
 1 5

<210> 46
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина

<400> 46

Gly Ala Val Trp Thr Val Asp Glu Leu
 1 5

<210> 47
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина
 <400> 47
 Ala Val Pro Gln Ser Ser Tyr Pro Leu
 1 5

<210> 48
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина
 <400> 48
 Ala Ala Pro Lys Ala Ser Asp Leu Leu
 1 5

<210> 49
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина
 <400> 49
 Phe Ser Leu Lys Ala Arg Pro Gly Leu
 1 5

<210> 50
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина
 <400> 50
 Asn Ala Ile Arg His Asn Leu Ser Leu
 1 5

<210> 51
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина
 <400> 51
 Val Pro Gln Ser Ser Tyr Pro Leu Leu
 1 5

<210> 52
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина

<400> 52

Ala Thr Leu Ile Arg Trp Ala Ile Leu
 1 5

<210> 53
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина

<400> 53

Lys Trp Pro Gly Cys Glu Lys Val Phe
 1 5

<210> 54
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина

<400> 54

Gln Leu Gln Leu Pro Thr Leu Pro Leu
 1 5

<210> 55
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина

<400> 55

Thr Tyr Ala Thr Leu Ile Arg Trp Ala
 1 5

<210> 56
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>

<223> пептидная вакцина

<400> 56

Thr Pro Val Leu Gln Val His Pro Leu
1 5

<210> 57

<211> 9

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> пептидная вакцина

<400> 57

Leu Asn Pro Met Pro Pro Ser Gln Leu
1 5

<210> 58

<211> 9

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> пептидная вакцина

<400> 58

Glu Trp Val Ser Arg Glu Pro Ala Leu
1 5

<210> 59

<211> 9

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> пептидная вакцина

<400> 59

Ser Ala Pro Arg Lys Asp Ser Thr Leu
1 5

<210> 60

<211> 9

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> пептидная вакцина

<400> 60

Leu Gln Arg Glu Met Val Gln Ser Leu
1 5

<210> 61
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина

<400> 61

Ser Leu Phe Ala Val Arg Arg His Leu
 1 5

<210> 62
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина

<400> 62

Thr Leu Asn Glu Ile Tyr His Trp Phe
 1 5

<210> 63
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина

<400> 63

Arg Ala Ala Pro Lys Ala Ser Asp Leu Leu
 1 5 10

<210> 64
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина

<400> 64

Lys Val Phe Glu Glu Pro Glu Asp Phe Leu
 1 5 10

<210> 65
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина

<400> 65

Lys Gly Ala Val Trp Thr Val Asp Glu Leu
1 5 10

<210> 66

<211> 10

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> пептидная вакцина

<400> 66

Glu Met Val Gln Ser Leu Glu Gln Gln Leu
1 5 10

<210> 67

<211> 10

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> пептидная вакцина

<400> 67

Gly Pro Leu Pro His Leu Gln Ala Leu Leu
1 5 10

<210> 68

<211> 10

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> пептидная вакцина

<400> 68

Asp Ser Leu Phe Ala Val Arg Arg His Leu
1 5 10

<210> 69

<211> 10

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> пептидная вакцина

<400> 69

Arg Thr Leu Asn Glu Ile Tyr His Trp Phe
1 5 10

<210> 70

<211> 10

<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> пептидная вакцина

<400> 70

Arg	Pro	Gly	Lys	Pro	Ser	Ala	Pro	Ser	Leu
1				5					10

<210> 71
<211> 10
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> пептидная вакцина

<400> 71

Lys	Asn	Ala	Ile	Arg	His	Asn	Leu	Ser	Leu
1				5					10

<210> 72
<211> 10
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> пептидная вакцина

<400> 72

Ser	Tyr	Pro	Leu	Leu	Ala	Asn	Gly	Val	Cys
1				5					10

<210> 73
<211> 10
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> пептидная вакцина

<400> 73

Leu	Gly	Pro	Leu	Pro	His	Leu	Gln	Ala	Leu
1				5					10

<210> 74
<211> 10
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> пептидная вакцина

<400> 74

Ser Leu Asn Pro Met Pro Pro Ser Gln Leu
1 5 10

<210> 75
<211> 10
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> пептидная вакцина

<400> 75

Ser Ala Val Pro Gln Ser Ser Tyr Pro Leu
1 5 10

<210> 76
<211> 10
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> пептидная вакцина

<400> 76

Asn Pro Met Pro Pro Ser Gln Leu Gln Leu
1 5 10

<210> 77
<211> 10
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> пептидная вакцина

<400> 77

Leu Leu Gln Arg Glu Met Val Gln Ser Leu
1 5 10

<210> 78
<211> 10
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> пептидная вакцина

<400> 78

Gln Gln Leu Val Leu Glu Lys Glu Lys Leu
1 5 10

<210> 79
<211> 10
<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> пептидная вакцина

<400> 79

Ala Val Pro Gln Ser Ser Tyr Pro Leu Leu
1 5 10

<210> 80

<211> 10

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> пептидная вакцина

<400> 80

Leu Pro Pro Gly Ile Asn Val Ala Ser Leu
1 5 10

<210> 81

<211> 10

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> пептидная вакцина

<400> 81

Ser Gly Pro Arg Glu Ala Pro Asp Ser Leu
1 5 10

<210> 82

<211> 10

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> пептидная вакцина

<400> 82

Val Met Val Ala Pro Ser Gly Ala Arg Leu
1 5 10

<210> 83

<211> 10

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> пептидная вакцина

<400> 83

Glu Trp Val Ser Arg Glu Pro Ala Leu Leu

1	5	10
---	---	----

<210> 84
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина

<400> 84

Ser	Gln	Leu	Gln	Leu	Pro	Thr	Leu	Pro	Leu
1				5					10

<210> 85
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина

<400> 85

His	Gly	Asn	Ser	Thr	Phe	Pro	Glu	Phe	Leu
1				5					10

<210> 86
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина

<400> 86

Thr	Trp	Lys	Asn	Ala	Ile	Arg	His	Asn	Leu
1				5					10

<210> 87
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина

<400> 87

Ile	Tyr	His	Trp	Phe	Thr	Arg	Met	Phe	Ala
1				5					10

<210> 88
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина
 <400> 88
 Lys Leu Gly Ala Met Gln Ala His Leu
 1 5

<210> 89
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина
 <400> 89
 Lys Tyr Ser Ala Met Gln Ala His Leu
 1 5

<210> 90
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина
 <400> 90
 Lys Phe Ser Ala Met Gln Ala His Leu
 1 5

<210> 91
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина
 <400> 91
 Lys Tyr Ser Ala Met Gln Ala His Ile
 1 5

<210> 92
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина
 <400> 92
 Lys Tyr Ser Ala Met Gln Ala His Phe
 1 5

<210> 93
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина

<400> 93

Lys Phe Ser Ala Met Gln Ala His Ile
 1 5

<210> 94
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина

<400> 94

Lys Phe Ser Ala Met Gln Ala His Phe
 1 5

<210> 95
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина

<400> 95

Lys Leu Ser Ala Met Gln Ala His Val
 1 5

<210> 96
 <211> 9
 <212> Белок

<213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина

<400> 96

Lys Leu Tyr Ala Met Gln Ala His Leu
 1 5

<210> 97
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
<223> пептидная вакцина

<400> 97

Lys Leu Met Ala Met Gln Ala His Leu
1 5

<210> 98
<211> 9
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> пептидная вакцина

<400> 98

Lys Leu Leu Ala Met Gln Ala His Leu
1 5

<210> 99
<211> 9
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> пептидная вакцина

<400> 99

Lys Leu Phe Ala Met Gln Ala His Leu
1 5

<210> 100
<211> 9
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> пептидная вакцина

<400> 100

Lys Leu Tyr Ala Met Gln Ala His Val
1 5

<210> 101
<211> 9
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>
<223> пептидная вакцина

<400> 101

Lys Leu Met Ala Met Gln Ala His Val
1 5

<210> 102
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина

<400> 102

Lys Leu Leu Ala Met Gln Ala His Val
 1 5

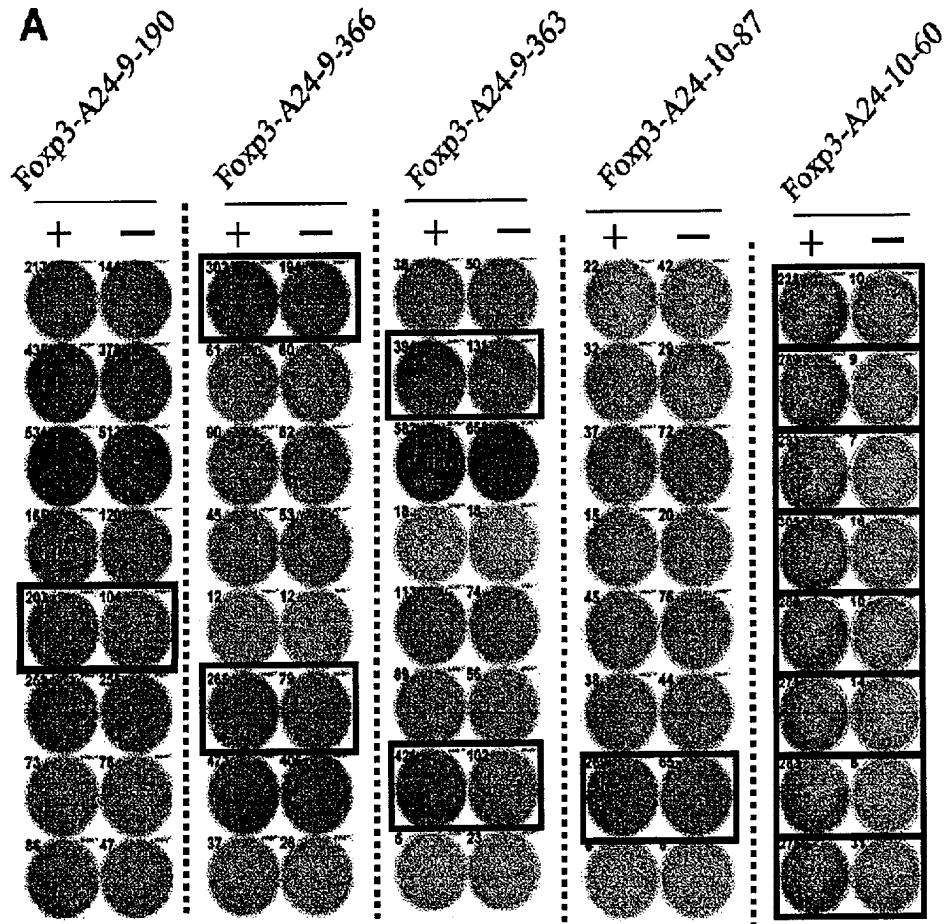
<210> 103
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> пептидная вакцина

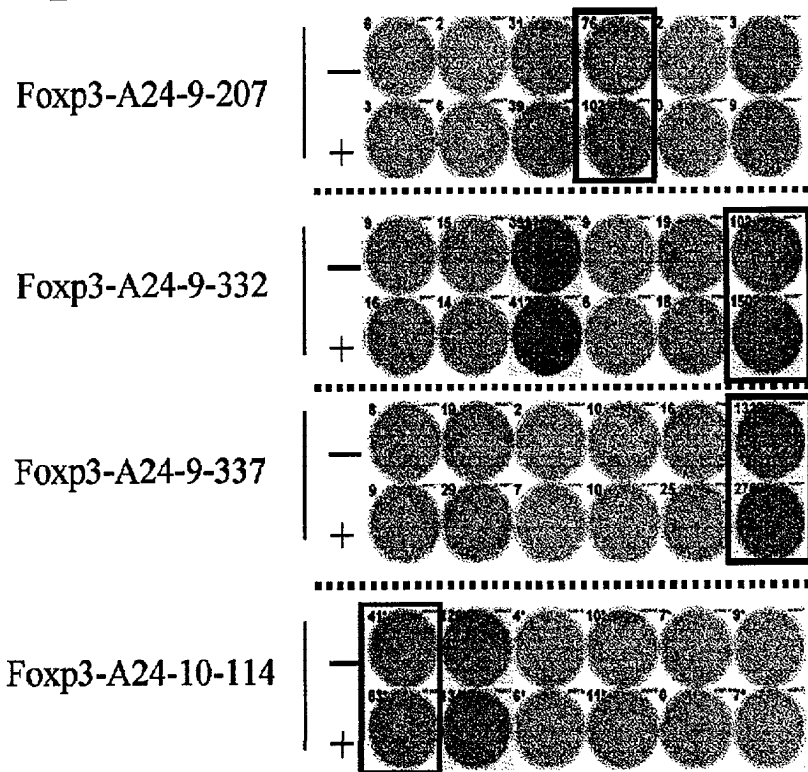
<400> 103

Lys Leu Phe Ala Met Gln Ala His Val
 1 5

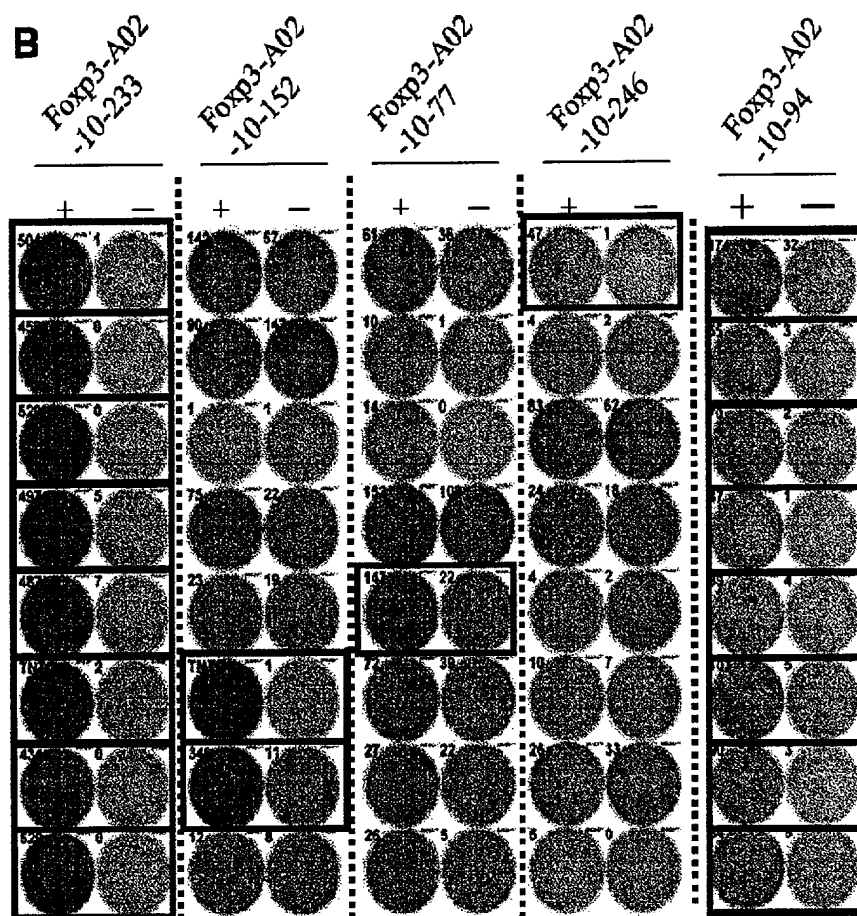
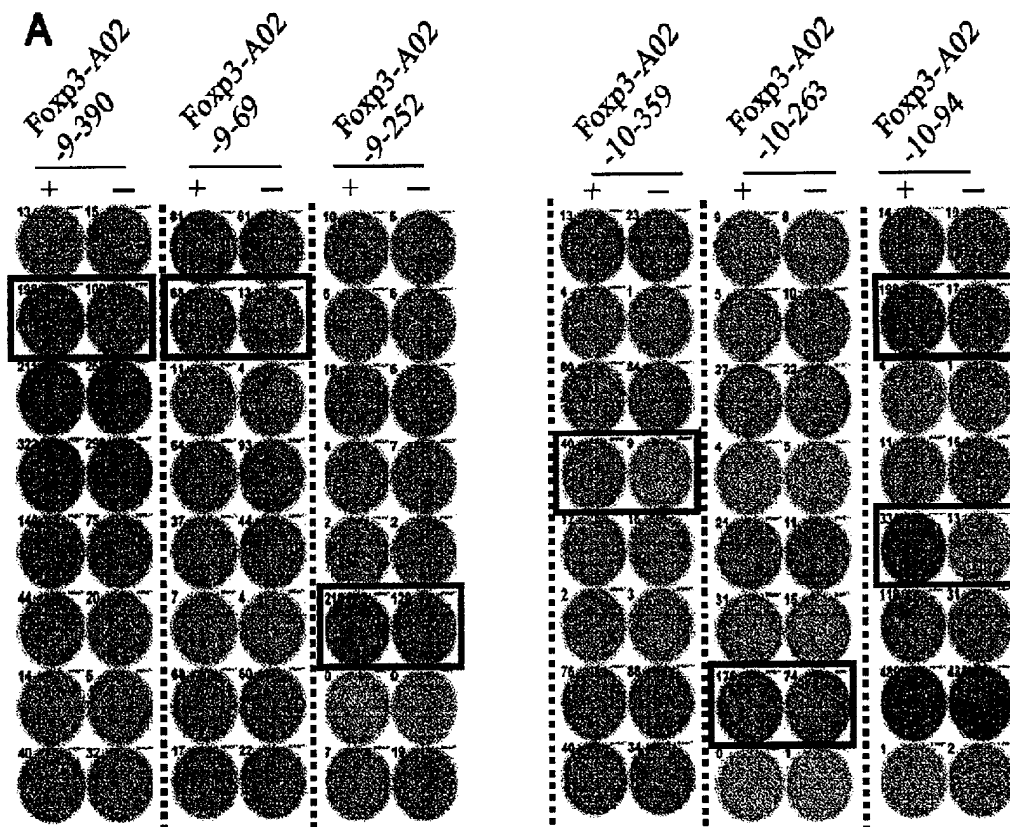
A



B



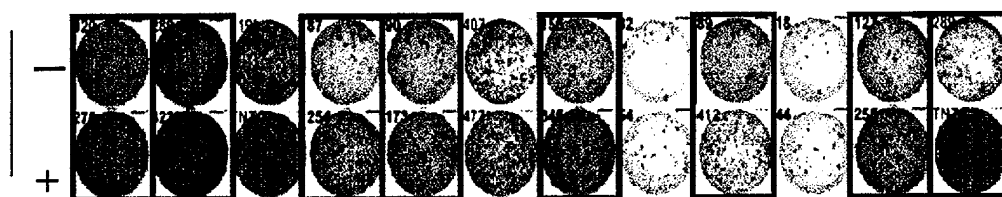
ФИГ. 1



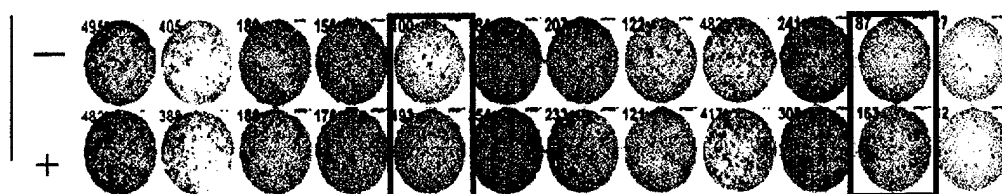
ФИГ.2А-В

C

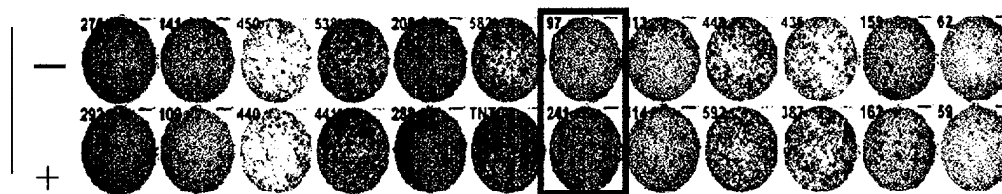
Foxp3-A2-9-390



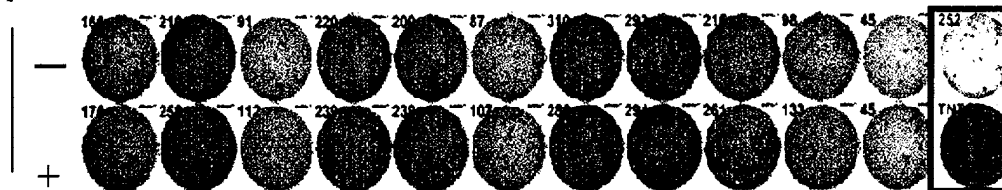
Foxp3-A2-9-304



Foxp3-A2-9-68

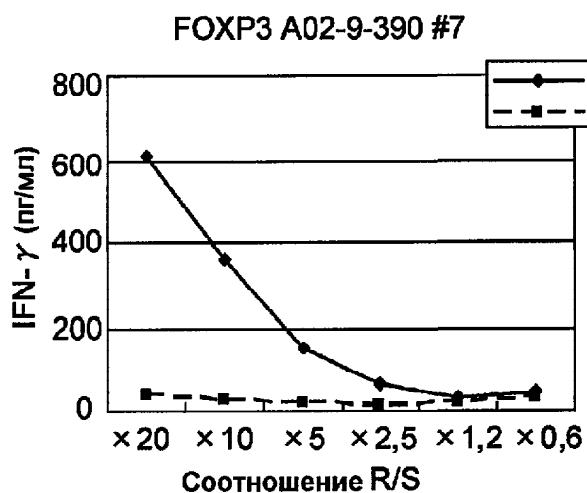
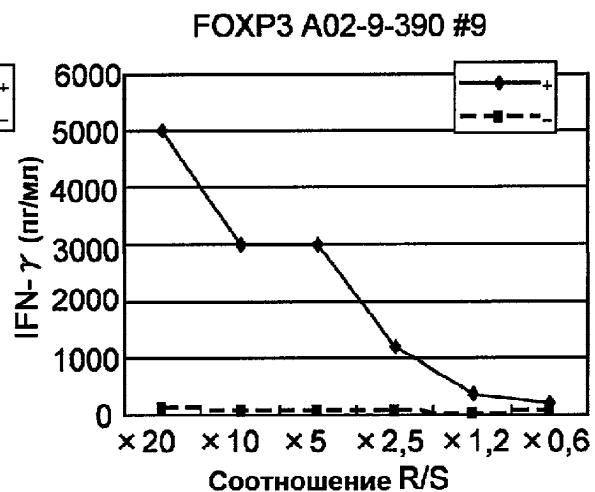
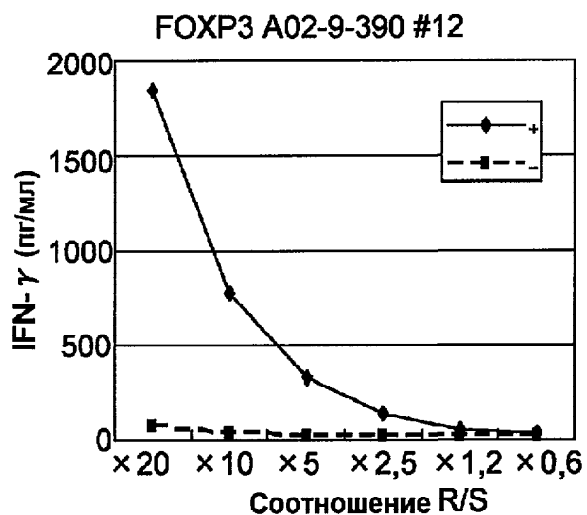
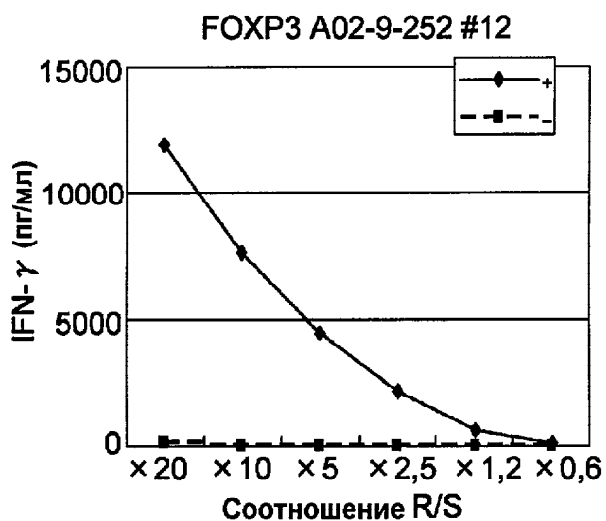


Foxp3-A2-9-252

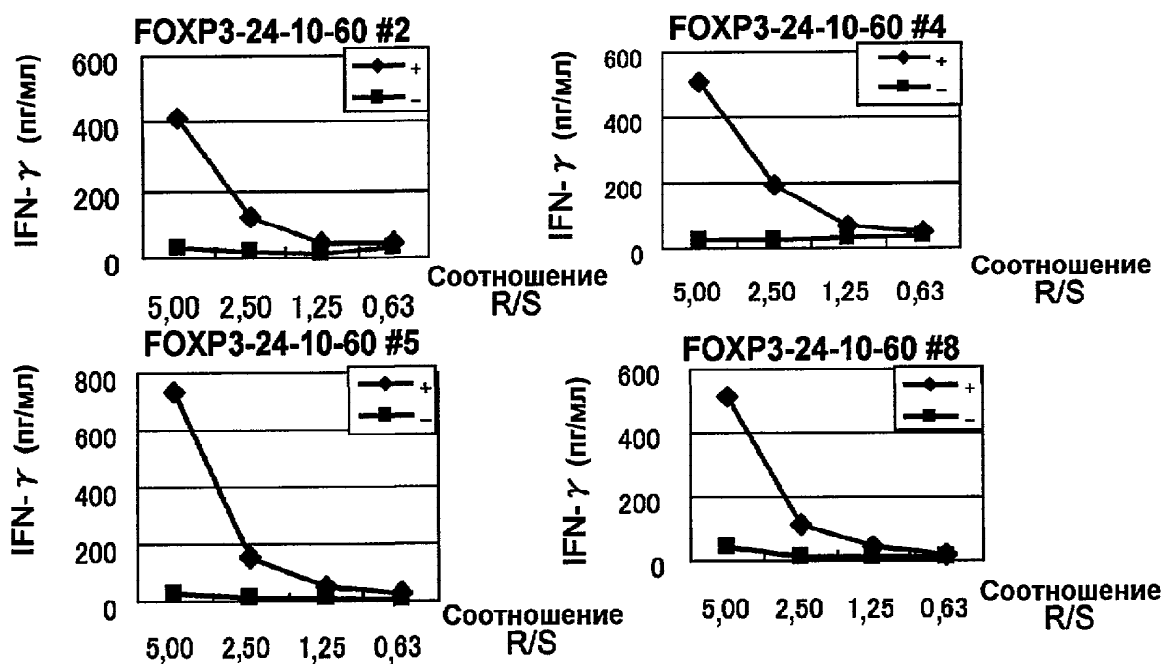
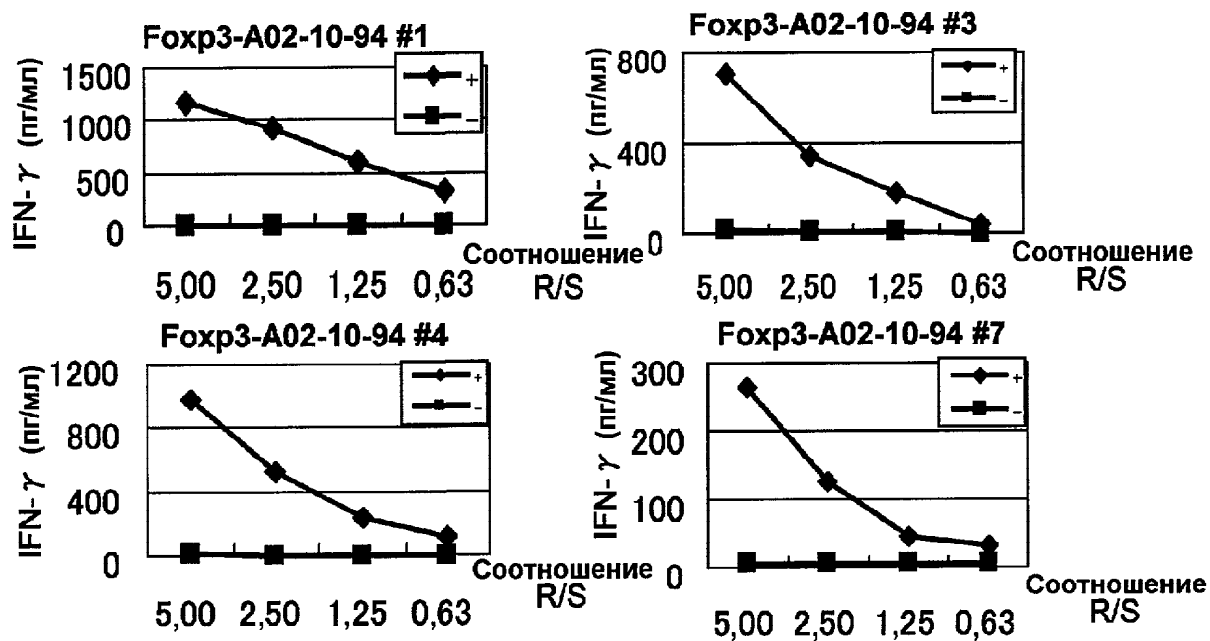
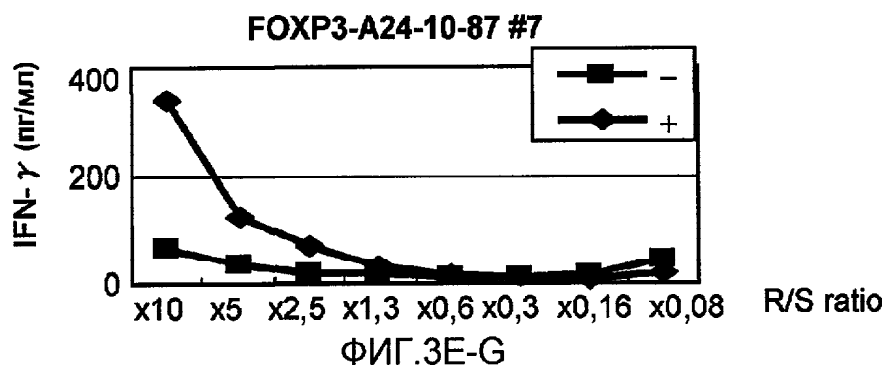


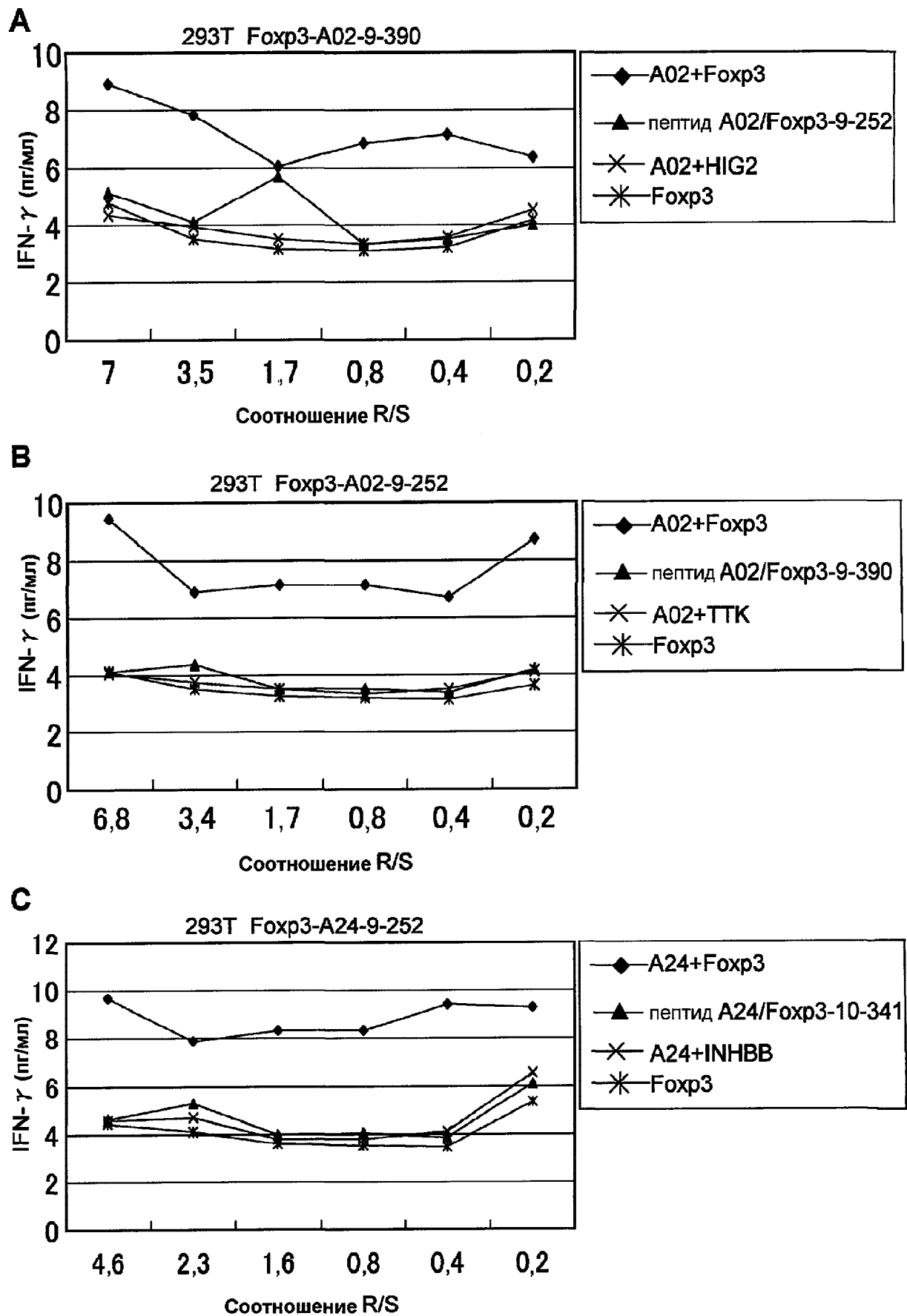
ФИГ.2С

Создание клеточных линий CTL, стимулированных
Foxp3-A02-9-390 или Foxp3-A02-9-252

A**B****C****D**

ФИГ.3А-D

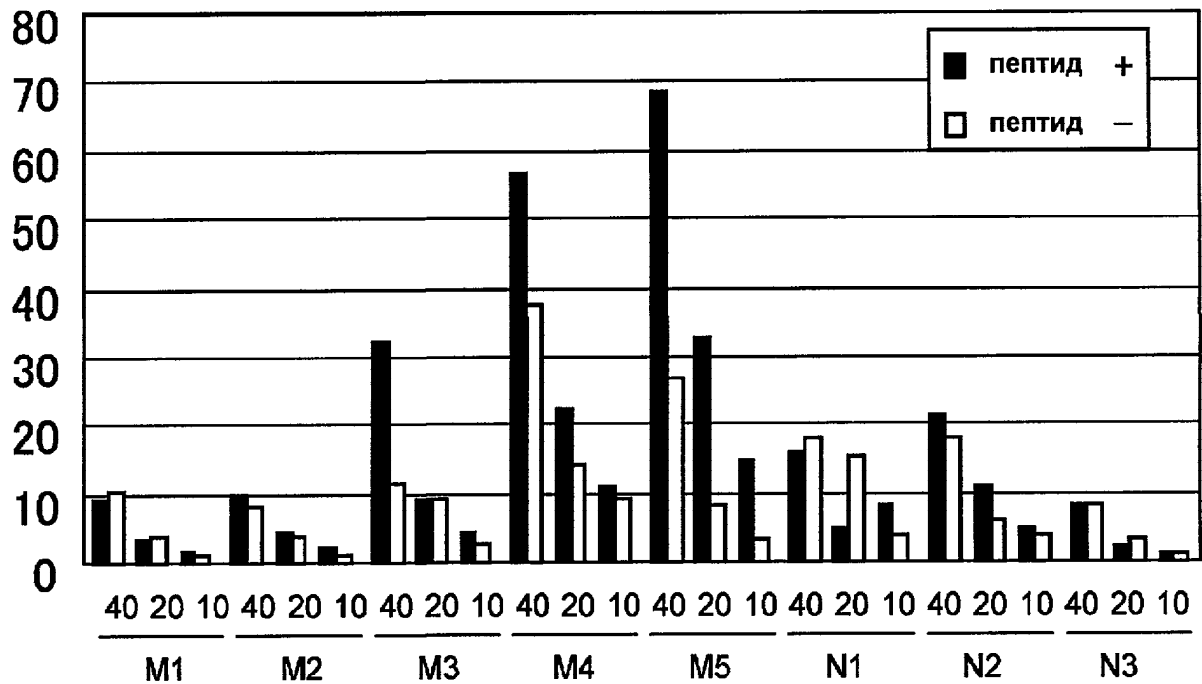
E**F****G**



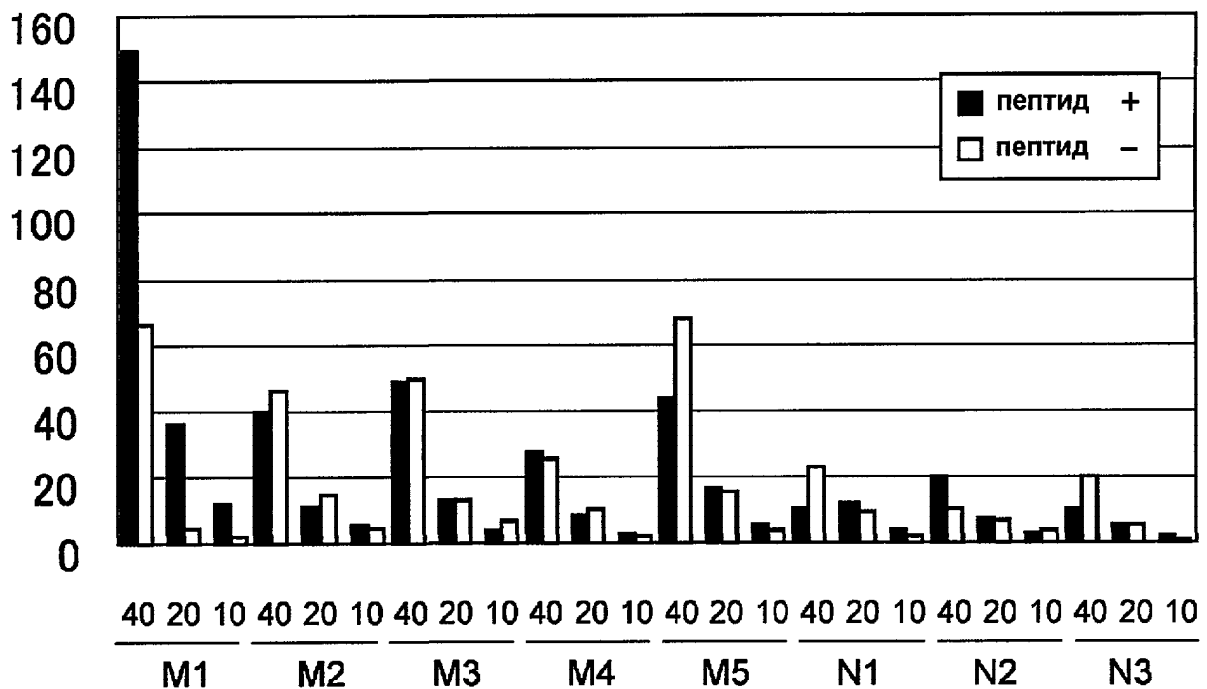
ФИГ.4

A**Foxp3-9-252_h**

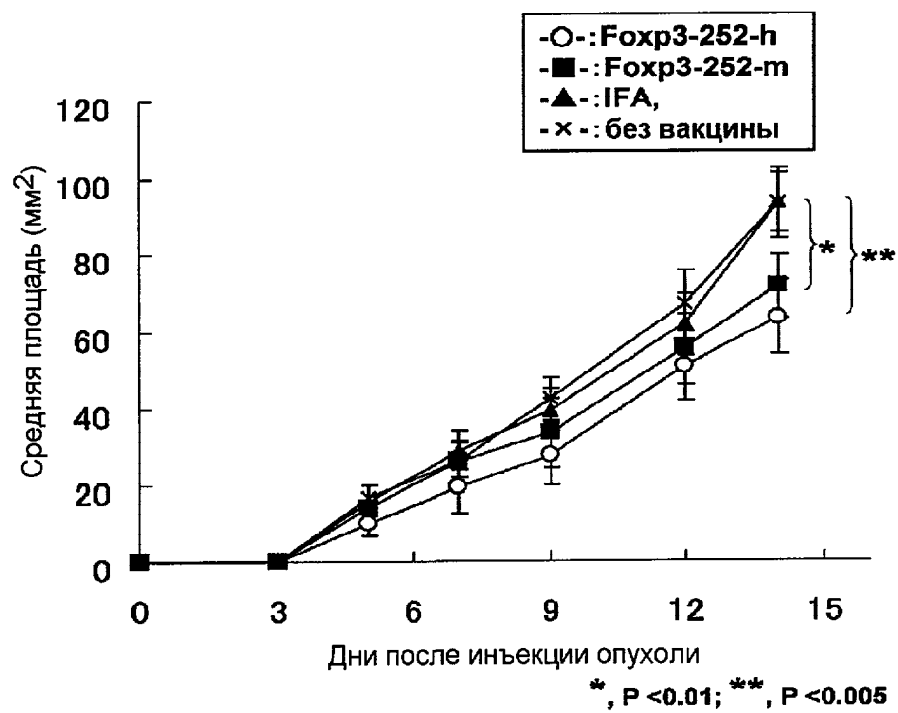
Клетки, образующие ореол

**B****Foxp3-9-252_m**

Клетки, образующие ореол

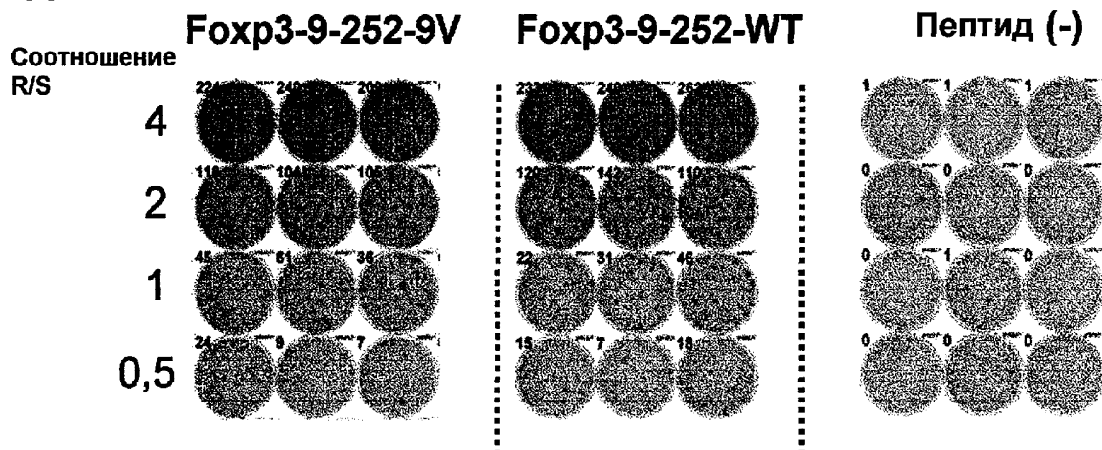


ФИГ.5



ФИГ.6

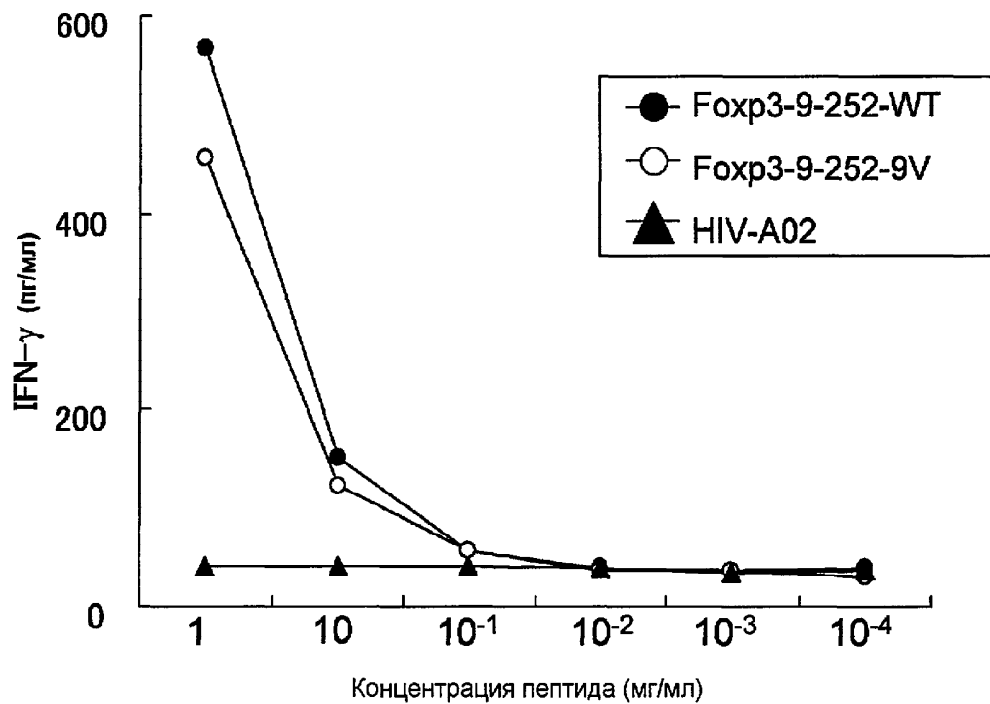
A



Респондер: Foxp3-9-252-WT CTL

Стимулятор: клетки T2,
стимулированные пептидом

B



ФИГ.7А-В

