



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **128576** (13) **C2**
(51) МПК (2024.01)**C07K 7/06** (2006.01)**A61K 38/17** (2006.01)**A61K 39/00****C07K 16/28** (2006.01)**C07K 7/08** (2006.01)**C07K 14/47** (2006.01)**A61P 35/00**

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**(21)** Номер заявки: **a 2018 08859****(22)** Дата подання заявки: **15.03.2017****(24)** Дата, з якої є чинними
права інтелектуальної
власності: **22.08.2024****(31)** Номер попередньої
заявки відповідно до
Паризької конвенції: **1604458.8,
62/308,944****(32)** Дата подання
попередньої заявки
відповідно до
Паризької конвенції: **16.03.2016,
16.03.2016****(33)** Код держави-учасниці
Паризької конвенції,
до якої подано
попередню заявку: **GB,
US****(41)** Публікація відомостей
про заявку: **10.12.2018, Бюл.№ 23****(46)** Публікація відомостей
про державну
реєстрацію: **21.08.2024, Бюл.№ 34****(86)** Номер та дата
подання міжнародної
заявки, поданої
відповідно до
Договору РСТ **PCT/EP2017/056049,
15.03.2017****(72)** Винахідник(и):**Мар Андреа (DE),****Шор Олівер (DE),****Вайншенк Тоні (DE)****(73)** Володілець (володільці):**ІММАТІКС БІОТЕХНОЛОДЖІС ГМБХ,****Paul-Ehrlich-Straße 15, 72076 Tübingen,
Germany (DE)****(74)** Представник:**Шпакович Тетяна Іванівна, реєстр. №240****(56)** Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:**CN 101870725 A, 27.10.2010****EP 2752198 A1, 09.07.2014****WO 2015172843 A1, 19.11.2015****WO 2006091734 A2, 31.08.2006****EP 2119726 A1, 18.11.2009****WO 2015063302 A2, 07.05.2015****EP 1306431 A1, 02.05.2003****WO 0141741 A1, 14.06.2001****WO 2011066265 A1, 03.06.2011****WU Z.Y. et al. Identification of a novel CD8+ T
cell epitope derived from cancer-testis antigen
MAGE-4 in oesophageal carcinoma / Zheng-
Cai Jia, Bing Ni, Ze-Min Huang, Yi Tian, Jun
Tang, Jing-XueWang, Xiao-Lan Fu and Yu-
ZhangWu // Scandinavian journal of
immunology. - 14.12.2011. - Vol. 74. - no. 6. -
P. 561 - 567****ZHENG-CAI J. et al. Identification of two novel
HLA-A* 0201 - restricted CTL epitopes derived
from MAGE-A4 / Z. Y. Wu, Y. F. Gao, Y. H.
Wu, W. Liu, M. Sun, M. X. Zhai, Y. M. Qi and
Y. Ye // Clinical & developmental immunology.
- 01.01.2010. - Vol. 2010. - P. 1 - 7****(54) ПЕПТИДИ ТА КОМБІНАЦІЇ ПЕПТИДІВ ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ ДЛЯ ІМУНОТЕРАПІЇ
НЕДРІБНОКЛІТИННОГО РАКУ ЛЕГЕНЬ ТА ІНШИХ ВИДІВ РАКУ****(57)** Реферат:**UA 128576 C2**

Винахід стосується пептидів, білків, нуклеїнових кислот та клітин для їх застосування в імунотерапії. Зокрема, цей винахід стосується імунотерапії раку. Цей винахід також стосується епітопів пухлино-асоційованих пептидів Т-клітин, які самостійно або в комбінації з іншими пухлино-асоційованими пептидами можуть, наприклад, служити активними фармацевтичними інгредієнтами композицій вакцин, які стимулюють протипухлинні імунні відповіді, або стимулювати Т-клітини *ex vivo* з їх перенесенням в організм пацієнта. Пептиди, зв'язані з молекулами головного комплексу гістосумісності (МНС), або пептиди як такі можуть також бути мішенями для антитіл, розчинних Т-клітинних рецепторів та інших зв'язувальних молекул.

Цей опис стосується пептидів, білків, нуклеїнових кислот та клітин для їх застосування в імунотерапії. Зокрема, цей опис стосується імунотерапії раку. Цей опис також стосується епітопів пухлино-асоційованих пептидів Т-клітин, які самостійно або в комбінації з іншими пухлино-асоційованими пептидами можуть, наприклад, служити активними фармацевтичними інгредієнтами композицій вакцин, які стимулюють протипухлинні імунні відповіді, або стимулювати Т-клітини *ex vivo* з їх перенесенням в організм пацієнта. Пептиди, зв'язані з молекулами головного комплексу гістосумісності (МНС), або пептиди як такі можуть також бути мішенями для антитіл, розчинних Т-клітинних рецепторів та інших зв'язувальних молекул.

Цей опис також стосується використання вищезазначених пептидів для отримання специфічних Т-клітинних рецепторів (ТКР) що зв'язують пухлино-асоційовані антигени (ТАА), для націлювання на ракові клітини, для отримання Т-клітин, що експресують вищезгадане, і способів лікування ракових захворювань із застосуванням вищезгаданого. Нові пептидні послідовності та їх варіанти, отримані з молекул HLA I класу пухлинних клітин людини, можуть застосовуватися у вакцинних композиціях з метою викликати протипухлинну імунну відповідь або як мішені для розробки фармацевтично або імунологічно активних сполук і клітин. Переважним є пептид, який містить амінокислотну послідовність KVLEHVVVRV (SEQ ID NO: 1).

ПЕРЕДУМОВА СТВОРЕННЯ ВІНАХОДУ

Недрібноклітинний рак легенів (НДРЛ) отримав свою назву відповідно до розміру ракових клітин, коли їх розглядають під мікроскопом, і його треба відрізняти від дрібноклітинного раку легенів (ДРЛ). Доля НДРЛ серед усіх випадків раку легенів становить приблизно 85–90 % (American Cancer Society, 2015).

Обидва типи раку (ДРЛ і НДРЛ) разом є другим за поширеністю видом раку як серед чоловіків, так і серед жінок. Рак легенів є головною причиною смерті від раку, що становить приблизно 25 %. Отже, більше людей вмирає кожний рік від раку легенів, ніж від раку товстої кишки, молочної залози і передміхурової залози, разом узятих. До того ж, обидва типи раку легенів становлять приблизно 13 % (більш ніж 1,8 мільйона випадків) від усіх щойно діагностованих випадків раку. Рак легенів головним чином вражає літніх людей. Середній вік під час встановлення діагнозу становить приблизно 70 років. Менш ніж 2 % усіх випадків діагностується у людей молодше 45 років.

Існує чотири основні типи НДРЛ, а саме аденокарцинома, пласкоклітинна карцинома, бронхоальвеолярна карцинома і великоклітинна карцинома. Аденокарцинома і пласкоклітинна карцинома є найбільш поширеними типами НДРЛ, виходячи з морфології клітин (Travis et al., Lung Cancer Principles and Practice, Lippincott-Raven, New York, 361-395, 1996). Аденокарциномам властива більш периферична локалізація у легені і вони часто мають мутацію онкогена K-ras (Gazdar et al., Anticancer Res., 14, 261-267, 1994). Пласкоклітинні карциноми як правило мають більш центральне розташування і вони часто несуть мутації в гені p53 (Niklinska et al., Folia Histochem. Cytobiol., 39, 147-148, 2001).

Повідомлялося про велику кількість генетичних змін, які асоціюються з розвитком і прогресуванням раку легенів, але конкретний молекулярний механізм залишається невідомим (Sozzi, G. Eur. J. Cancer 37: 63-73 (2001)). Більшість випадків НДРЛ характеризуються присутністю мутації *ras*, у зв'язку з цим пацієнт стає відносно нечутливим до лікування відомими інгібіторами кіназ. У результаті сучасні методи лікування раку легенів зазвичай обмежені цитотоксичними лікарськими препаратами, хірургією та променевою терапією. Протягом останнього десятиріччя з'явилися нещодавно розроблені цитотоксичні засоби, включаючи паклітаксел, доцетаксел, гемцитабін і вінорельбін, надаючи різні варіанти вибору для терапії пацієнтів з поширеним НДРЛ. Однак кожна з цих нових схем може забезпечити лише обмежені переваги щодо виживаності у порівнянні з лікуванням на основі цисплатину (Schiller, J. H. et al., N. Engl. J. Med. 346: 92-98 (2002); Kelly, K. et al., J. Clin. Oncol. 19: 3210-3218 (2001)). Отже, клініцисти нетерпляче очікують появу нових терапевтичних стратегій, таких як розробка молекулярно спрямованих препаратів.

Імунотерапія раку являє собою варіант специфічного націлювання на ракові клітини, у той же час зводячи до мінімуму побічні ефекти. У імунотерапії раку використовується існування пухлино-асоційованих антигенів.

Сучасна класифікація пухлино-асоційованих антигенів (ТАА) охоплює наступні групи:

а) Раково-тестикулярні антигени. Перші будь-коли ідентифіковані ТАА, які можуть бути розпізнані Т-клітинами, належать до цього класу, які були спочатку названі раково-тестикулярними (СТ) антигенами завдяки експресії його представників у гістологічно різних пухлинах людини і, поряд із нормальними тканинами, тільки в сперматоцитах/сперматогоніальних клітинах яєчок і іноді в плаценті. Оскільки клітини яєчок не експресують молекули HLA I та II класу, ці антигени не можуть розпізнаватися Т-клітинами у

нормальних тканинах і можуть, таким чином, вважатися пухлинно-специфічними, з точки зору імунології. Добре відомими прикладами СТ антигенів є члени сімейства MAGE і NY-ESO-1.

б) Антигени диференціації. Ці ТАА розподілені між пухлинами та нормальними тканинами, з яких виникла пухлина. Більшість з відомих антигенів диференціації знайдена в меланомах і нормальних меланоцитах. Багато цих білків, пов'язаних із диференціацією у меланоцити, беруть участь у біосинтезі меланіну і тому не є пухлино-специфічними, але, тим не менше, широко застосовуються для імунотерапії раку. Приклади включають, без обмеження, тирозиназу і Melan-A/MART-1 для меланоми або ПСА для раку передміхурової залози.

в) Надмірно експресовані ТАА. Гени, що кодують ТАА, які широко експресуються, були виявлені в гістологічно різних типах пухлин, а також у багатьох нормальних тканинах, загалом з нижчими рівнями експресії. Можливо, що багато епітопів, що були процесовані і, можливо, презентовані нормальними тканинами, присутні у кількості, що нижча за пороговий рівень розпізнання Т-клітинами, в той час як їх надекспресія в пухлинних клітинах може запустити антиракову реакцію, порушивши раніш встановлену толерантність. Відомими прикладами для цього класу ТАА є Her-2/neu, сурвівін, теломераза або WT1.

г) Пухлино-специфічні антигени. Ці унікальні ТАА утворюються в результаті мутацій нормальних генів (таких як бета-катенін, CDK4 тощо). Деякі з цих молекулярних змін зв'язані з неопластичною трансформацією і (або) прогресуванням пухлини. Пухлино-специфічні антигени загалом можуть викликати сильні імунні відповіді, не спричиняючи ризику аутоімунних реакцій проти нормальних тканин. З іншого боку, ці ТАА у більшості випадків мають відношення тільки до певної пухлини, на якій вони були ідентифіковані, і зазвичай не є спільними для багатьох окремих пухлин. Специфічність пептиду до пухлини (або асоціація з пухлиною) може також виникати, якщо пептид походить із екзону пухлини (пухлино-асоційованого екзону) у випадку білків з пухлиноспецифічними (-асоційованими) ізоформами.

д) ТАА, що виникають в результаті посттрансляційних модифікацій. Такі ТАА можуть виникати з білків, які не є ні специфічними, ні надмірно експресованими у пухлинах, але, незважаючи на це, стають асоційованими з пухлинами в результаті посттрансляційних процесів, первинно активних у пухлинах. Прикладами ТАА цього класу є антигени, що виникають в результаті змін характеру глікозилювання, що приводить до утворення у пухлинах нових епітопів, таких як MUC1, або таких подій як білковий сплайсинг під час деградації, які можуть бути пухлино-специфічними, а можуть і не бути.

е) Онковірусні білки. Ці ТАА є вірусними білками, які можуть відігравати вирішальну роль в онкогенному процесі і, оскільки вони є чужорідними (не походять від людини), вони можуть викликати відповідь Т-клітин. Прикладами таких білків є білки вірусу папіломи людини типу 16, Е6 і Е7, які експресуються клітинами карциноми шийки матки.

Мішенями імунотерапії з використанням Т-клітин є пептидні епітопи, отримані з пухлино-асоційованих або пухлино-специфічних білків, які презентуються молекулами головного комплексу гістосумісності (МНС). Антигенами, які розпізнаються пухлино-специфічними Т-лімфоцитами, тобто їхніми епітопами, можуть бути молекули, що отримані з усіх класів білків, таких як ферменти, рецептори, фактори транскрипції тощо, які експресуються і, у порівнянні з незміненими клітинами того ж походження, активність яких підвищена у клітинах відповідної пухлини.

Існує два класи молекул МНС, МНС I класу і МНС II класу. Молекули МНС I класу складаються з альфа-важких ланцюгів і бета-2-мікроглобуліну, молекули МНС II класу складаються з альфа- і бета-ланцюгів. Їхня тривимірна конформація приводить до утворення зв'язувальної щілини, що використовується для нековалентної взаємодії з пептидами. Молекули МНС I класу можна виявити в більшості клітин, що мають ядро. Вони презентують пептиди, які утворюються в результаті протеолітичного розщеплення переважно ендегенних білків, дефектних рибосомальних продуктів (DRIP) та більш великих пептидів. Однак пептиди, одержані з ендосомальних компартментів чи екзогенних джерел, також часто зустрічаються на молекулах МНС I класу. Цей неklasичний спосіб презентації I класом називається у науковій літературі крос-презентацією (Brossart and Bevan, 1997; Rock et al., 1990). Молекули МНС II класу містяться головним чином на професійних антигенпрезентуючих клітинах (АПК) і презентують головним чином пептиди екзогенних або трансмембранних білків, які поглинаються АПК, наприклад, в ході ендоцитозу і згодом процесуються.

Комплекси пептидів і молекул МНС I класу розпізнаються CD8-позитивними Т-клітинами, що несуть відповідний Т-клітинний рецептор (ТКР), в той час як комплекси пептиду і молекул МНС II класу розпізнаються CD4-позитивними Т-хелперами, що несуть відповідний ТКР. Загальновідомо, що ТКР, пептид і МНС, таким чином, є присутніми у стехіометричних кількостях у співвідношенні 1:1:1.

CD4-позитивні Т-хелпери відіграють важливу роль, викликаючи та підтримуючи ефективну відповідь CD8-позитивних цитотоксичних Т-клітин. Ідентифікація епітопів CD4-позитивних Т-клітин, отриманих із пухлино-асоційованих антигенів (ТАА), може мати велике значення під час розробки фармацевтичних засобів для ініціювання протипухлинних імунних реакцій. (Gnjatic et al., 2003). У місці локалізації пухлини Т-хелперні клітини підтримують сприятливе для цитотоксичних Т-клітин (ЦТЛ) цитокінове середовище (Mortara et al., 2006) і притягують ефекторні клітини, наприклад, ЦТЛ, природні кілерні (NK) клітини, макрофаги і гранулоцити (Hwang et al., 2007).

За відсутності запалення експресія молекул МНС II класу обмежується головним чином клітинами імунної системи, особливо професійними антиген-презентуючими клітинами (АПК), наприклад, моноцитами, клітинами, що походять з моноцитів, макрофагами, дендритними клітинами. Було виявлено, що клітини пухлин у хворих на рак пацієнтів експресують молекули МНС II класу (Dengjel et al., 2006). Подовжені (довші) пептиди за цим описом можуть діяти як епітопи, активні по відношенню до молекул МНС II класу.

Т-хелперні клітини, активовані зв'язаними з молекулами МНС II класу епітопами, відіграють важливу роль в регуляції ефекторної функції ЦТЛ у протипухлинному імунитеті. Епітопи Т-хелперних клітин, які ініціюють реакцію Т-хелперів типу TH1, підтримують ефекторні функції CD8-позитивних Т-кілерів, котрі включають цитотоксичні функції, спрямовані проти клітин пухлини, що презентують комплекси пухлино-асоційованого пептиду/МНС на поверхнях своїх клітин. У такий спосіб епітопи пухлино-асоційованих пептидів Т-хелперів самостійно або в комбінації з іншими пухлино-асоційованих пептидами можуть служити активними фармацевтичними інгредієнтами композицій вакцин, які стимулюють протипухлинні імунні реакції.

На моделях тварин-ссавців, наприклад, на мишах, було показано, що навіть за відсутності CD8-позитивних Т-лімфоцитів, присутності CD4-позитивних Т-клітин виявляється достатньо для послаблення клінічних проявів пухлин шляхом інгібування ангіогенезу за рахунок секреції інтерферону-гамма (ІФН-гамма) (Beatty and Paterson, 2001; Mumberg et al., 1999). Існують докази, що Т-клітини є ефекторними клітинами прямої протипухлинної дії (Braumuller et al., 2013; Tran et al., 2014).

Оскільки конститутивна експресія молекул HLA II класу зазвичай обмежується клітинами імунної системи, раніше вважалось неможливим виділити пептиди II класу безпосередньо з первинних пухлин. Однак Dengjel і співавт. вдалося ідентифікувати декілька зв'язаних з молекулами МНС II класу епітопів безпосередньо із пухлин (WO 2007/028574, EP 1 760 088 B1).

Оскільки обидва типи відповіді, залежні від CD8 та CD4, спільно та синергічно роблять свій внесок у протипухлинну дію, для розробки протипухлинних вакцин важливими є ідентифікація та визначення характеристик пухлино-асоційованих антигенів, які розпізнаються або CD8+Т-клітинами (ліганд: молекули МНС I класу + пептидний епітоп), або CD4- позитивними Т-хелперними клітинами (ліганд: молекули МНС II класу + пептидний епітоп).

Щоб пептид, зв'язаний з молекулою МНС I класу, ініціював (викликав) клітинну імунну відповідь, він також має зв'язатися з молекулою МНС. Цей процес залежить від алеля молекули МНС і специфічних поліморфізмів амінокислотної послідовності пептиду. Пептиди, що зв'язуються з молекулами МНС I класу, зазвичай мають 8-12 амінокислотних залишків у довжину і зазвичай містять два консервативні залишки ("якорі") у своїй послідовності, які взаємодіють з відповідною зв'язувальною щілиною молекули МНС. У такий спосіб кожний алель МНС має "зв'язувальний мотив", що визначає, які пептиди зможуть специфічно зв'язатися зі зв'язувальною щілиною.

В імунній реакції, залежній від молекул МНС I класу, пептиди не тільки мають бути здатними зв'язатися з певними молекулами МНС I класу, що експресуються клітинами пухлини, але вони також мають згодом розпізнаватися Т-клітинами, що несуть специфічні Т-клітинні рецептори (ТКР).

Для того, щоб білки розпізнавалися Т-лімфоцитами як пухлино-специфічні або пухлино-асоційовані антигени, та щоб їх було можливо застосовувати в терапії, необхідно створити особливі передумови. Антиген має експресуватися, головним чином, пухлинними клітинами і не експресуватися або експресуватися у порівняно невеликих кількостях нормальними здоровими тканинами. В переважному втіленні вищезгаданий пептид має надмірно презентуватися пухлинними клітинами у порівнянні з нормальними здоровими тканинами. До того ж бажано, щоб відповідний антиген не тільки був присутнім у пухлині певного типу, але також був присутнім у високих концентраціях (тобто як декілька копій відповідного пептиду на одну клітину). Пухлино-специфічні та пухлино-асоційовані антигени часто отримують із білків, які беруть безпосередню участь у трансформації нормальної клітини в пухлинну клітину, завдяки їх

функції, наприклад, в контролі клітинного циклу або пригніченні апоптозу. Крім цього, низхідні мішені білків, що також є безпосередньою причиною трансформації, можуть мати підвищену експресію і, таким чином, можуть бути опосередковано пухлино-асоційованими. Такі опосередковано пухлино-асоційовані антигени також можуть бути мішенями у вакцинаційному підході (Singh-Jasuja et al., 2004). Важливим є те, щоб в амінокислотній послідовності антигену були присутні епітопи, оскільки такий пептид ("імуногенний пептид"), отриманий із пухлино-асоційованого антигену, має приводити до відповіді Т-клітин *in vitro* або *in vivo*.

Таким чином, ТАА є стартовою точкою для розробки Т-клітинної терапії, включаючи, але не обмежуючись ними, протипухлинні вакцини. Методи ідентифікації та визначення характеристик ТАА зазвичай базуються на використанні Т-клітин, які можна виділити з організму пацієнтів або здорових суб'єктів, або вони ґрунтуються на генерації різних профілів транскрипції або різному характері експресії пептидів тканинами пухлин і нормальними тканинами. Проте ідентифікація генів, які надмірно експресуються пухлинними тканинами або лініями пухлинних клітин людини, або селективно експресуються в таких тканинах або клітинних лініях, не дає точної інформації щодо використання антигенів, що кодуються цими генами, в імунній терапії. Причиною цього є те, що тільки окрема субпопуляція епітопів цих антигенів придатна для такого застосування, оскільки має бути присутня Т-клітина з відповідним ТКР, і імунологічна толерантність по відношенню до цього епітопу повинна бути відсутньою або мінімальною. Отже, у більш переважному втіленні цього винаходу важливо вибрати тільки ті надмірно або селективно презентовані пептиди, проти яких можна знайти функціонуючу Т-клітину і (або) Т-клітину, здатну до проліферації. Така функціонуюча Т-клітина визначається як Т-клітина, яка за стимуляції специфічним антигеном може бути клонована і здатна виконувати функції ефектору ("ефекторна Т-клітина").

У випадку націлювання специфічних ТКР (наприклад, розчинних ТКР) і антитіл або інших зв'язувальних молекул (каркасів) за цим описом імуногенність базових пептидів є вторинною. У цих випадках визначальним фактором є презентація.

Незважаючи на значний прогрес у теоретичних і клінічних дослідженнях щодо ТАА (Rosenbeg et al., *Nature Med.* 4: 321-7 (1998); Mukherji et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 92: 8078-82 (1995); Hu et al., *Cancer Res.* 56: 2479-83 (1996)), доступна лише обмежена кількість кандидатів у ТАА для лікування раку. ТАА, які інтенсивно експресуються у ракових клітинах і у той же час експресія яких обмежена раковими клітинами, були б перспективними кандидатами як мішені для імунотерапії. Крім того, очікується, що ідентифікація нових ТАА, що викликають потужні і специфічні протипухлинні імунні відповіді, стимулюватиме клінічне застосування стратегій вакцинації пептидами при лікуванні різних видів раку (Boon and van der Bruggen, *J. Exp. Med.* 183: 725-9 (1996); van der Bruggen et al., *Science* 254: 1643-7 (1991); Brichard et al., *J. Exp. Med.* 178: 489-95 (1993); Kawakami et al., *J. Exp. Med.* 180: 347-52 (1994); Shichijo et al., *J. Exp. Med.* 187: 277-88 (1998); Chen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 94: 1914-8 (1997); Harris, *J. Natl. Cancer Inst.* 88: 1442-5 (1996); Butterfield et al., *Cancer Res.* 59: 3134-42 (1999); Vissers et al., *Cancer Res.* 59: 5554-9 (1999); van der Burg et al., *J. Immunol* 156: 3308-14 (1996); Tanaka et al., *Cancer Res.* 57: 4465-8 (1997); Fujie et al., *Int. J. Cancer* 80: 169-72 (1999); Kikuchi et al., *Int. J. Cancer* 81: 459-66 (1999); Oiso et al., *Int. J. Cancer* 81: 387-94 (1999)).

До того ж, незважаючи на те, що був досягнутий прогрес у розробці молекулярно спрямованих препаратів для терапії раку, спектр видів пухлин, що відповідають на неї, так само як і ефективність цих лікарських препаратів все ще дуже обмежені. Отже, існує нагальна потреба у розробці нових протиракових препаратів, націлених на молекули, високо специфічні для злоякісних клітин, і які, ймовірно, спричинять мінімальні побічні реакції або зовсім не викликать їх. Є також потреба в ідентифікації інших чинників, які виконують роль біомаркерів раку взагалі і НДРЛ зокрема, які забезпечать кращу діагностику раку, оцінку прогнозу і передбачення успіху лікування.

В одному з аспектів цей опис стосується пептиду, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 24 або варіанта його послідовності, який принаймні на 65 %, переважно принаймні на 77 % і більш переважно принаймні на 85 % гомологічний (переважно принаймні на 75 % або принаймні на 85 % ідентичний) послідовності від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 24, де згаданий варіант зв'язується з МНС і (або) викликає перехресну реакцію Т-клітин із згаданим пептидом, або його фармацевтично прийнятною солі, де згаданий пептид не є базовим повнорозмірним поліпептидом.

Цей опис також стосується пептиду за цим описом, що містить послідовність, вибрану з групи від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 24 або варіанта його послідовності, який принаймні на 65 %, переважно принаймні на 75 % і більш переважно принаймні на 85 % гомологічний (переважно принаймні на 75 % або принаймні на 85 % ідентичний) послідовності від SEQ ID NO:

1 до SEQ ID NO: 24, де згаданий пептид або його варіант має загальну довжину між 8 і 100, переважно між 8 і 30 і найбільш переважно між 8 і 14 амінокислот, де згаданий пептид або варіант зв'язується з МНС і (або) викликає перехресну реакцію Т-клітин із згаданим пептидом, або його фармацевтично прийнятною солі.

5 У наступних таблицях наведені пептиди за цим описом та їх відповідні SEQ ID NO.

Таблиця 1

Пептиди за цим описом

SEQ ID NO:	Послідовність
1	KVLEHVVRV
2	KVLEHVVR
3	KVLEHVVR
4	KVLEHVVR
5	KLEHVVRV
6	KLEHVVR
7	KLEHVVR
8	KLEHVVR
9	KLEHVVRV
10	KLEHVVR
11	KLEHVVR
12	KLEHVVR
13	YLEHVVRV
14	YLEHVVR
15	YLEHVVR
16	YLEHVVR
17	YLEHVVRV
18	YLEHVVR
19	YLEHVVR
20	YLEHVVR
21	YVLEHVVRV
22	YVLEHVVR
23	YVLEHVVR
24	YVLEHVVR

В іншому аспекті цей опис стосується пептиду MAG-003, наприклад виділеного пептиду, що містить амінокислотну послідовність за нижченаведеною загальною формулою I:

10 $X_1X_2LEHVVRX_3$ (SEQ ID NO: 5)

Формула I

де X_1 вибраний з амінокислот K і Y, X_2 вибраний з амінокислот V, L and A, та X_3 вибраний із V, L, A та I, де згаданий пептид зв'язується з молекулою HLA I класу або з молекулою HLA I класу або II класу і (або) викликає перехресну реакцію Т-клітин із згаданим пептидом, або його фармацевтично прийнятною солі. В одному аспекті згаданий пептид не є базовим повнорозмірним поліпептидом.

20 Цей опис також загалом стосується пептидів за цим описом для застосування при лікуванні проліферативного захворювання, такого як недрібноклітинний рак легенів, дрібноклітинний рак легенів, нирковоклітинний рак, рак головного мозку, рак шлунка, колоректальний рак, гепатоцелюлярний рак, рак підшлункової залози, рак передміхурової залози, лейкоз, рак молочної залози, карцинома з клітин Меркеля, меланома, рак яєчника, рак сечового міхура, рак матки, рак жовчного міхура і рак жовчних протоків і рак стравоходу.

25 Особливо переважними є пептиди – для застосування самостійно або в комбінації – за цим описом, вибрані з групи послідовностей від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 24. Більш переважними є пептиди – для застосування самостійно або в комбінації – за цим описом, вибрані з групи послідовностей від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 24 (див. Таблицю 1), і їх застосування при імунотерапії недрібноклітинного раку легенів, дрібноклітинного раку легенів, нирковоклітинного раку, раку головного мозку, раку шлунка, колоректального раку, гепатоцелюлярного раку, раку підшлункової залози, раку передміхурової залози, лейкозу, раку молочної залози, карциноми з клітин Меркеля, меланоми, раку яєчника, раку сечового міхура,

раку матки, раку жовчного міхура і раку жовчних протоків і раку стравоходу і переважно гліобластоми, раку шлунка, раку легенів, гепатоцелюлярної карциноми, колоректального раку, раку підшлункової залози, раку стравоходу, раку яєчника і недрібноклітинного раку легенів.

5 Цей опис також стосується пептидів за цим описом, які здатні зв'язуватись з молекулою головного комплексу гістосумісності (МНС) людини I класу або – у подовженій формі, такий як відмінний за довжиною варіант – МНС II класу.

Цей опис також стосується пептидів за цим описом, де згадані пептиди (кожний із них) складаються або по суті складаються з амінокислотної послідовності від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 24.

10 Цей опис також стосується пептидів за цим описом, де згаданий пептид є модифікованим і (або) включає непептидні зв'язки.

Цей опис також стосується пептидів за цим описом, де згаданий пептид є частиною злитого білка, зокрема злитого з N-термінальними амінокислотами HLA-DR антиген-асоційованого інваріантного ланцюга (Ii) або злитого з послідовністю (або вбудованого у послідовність) антитіла, наприклад, антитіла, що є специфічним до дендритних клітин.

15 Цей опис також стосується нуклеїнової кислоти, що кодує пептиди за цим описом. Цей опис також стосується нуклеїнової кислоти за цим описом, яка являє собою ДНК, кДНК, ПНК, РНК чи їх комбінацію.

Цей опис також стосується вектора експресії, що здатний експресувати і (або) експресує нуклеїнову кислоту за цим описом.

20 Цей опис також стосується пептиду за цим описом, нуклеїнової кислоти за цим описом або вектора експресії за цим описом для застосування для лікування захворювань і в медицині, зокрема в лікуванні раку.

Цей опис також стосується антитіл, які є специфічними по відношенню до пептидів за цим описом або комплексів згаданих пептидів за цим описом з МНС та способів їх отримання.

25 Цей опис також стосується клітини-хазяїна за цим описом, що містить нуклеїнову кислоту за цим описом або вектор експресії, як зазначено вище.

Цей опис також стосується клітини-хазяїна за цим описом, яка є антиген-презентуючою клітиною, і переважно дендритною клітиною.

30 Цей опис також стосується способу отримання пептиду за цим описом, причому спосіб включає культивування клітини-хазяїна за цим описом і виділення пептиду зі згаданої клітини-хазяїна або її культурального середовища.

Цей опис також стосується способу за цим описом, де антиген навантажують на молекули МНС I або II класу, що експресуються на поверхні відповідної антиген-презентуючої клітини або штучної антиген-презентуючої клітини шляхом контакту достатньої кількості антигену з антиген-презентуючою клітиною.

35 Цей опис також стосується способу за цим описом, де антиген-презентуюча клітина містить вектор експресії, що здатний експресувати і (або) експресує згаданий пептид, що містить послідовність від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID No.: 24, переважно, що містить послідовність від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 24 або варіант амінокислотної послідовності.

40 Цей опис також стосується активованих Т-клітин, отриманих згідно способу за цим описом, де згадана Т-клітина селективно розпізнає клітину, яка експресує поліпептид, що містить амінокислотну послідовність за цим описом.

45 Цей опис також стосується способу знищення клітин-мішеней в організмі пацієнта, клітини-мішені якого аберадно експресують поліпептид, що містить будь-яку амінокислотну послідовність за цим описом, причому спосіб включає введення в організм пацієнта ефективної кількості Т-клітин за цим описом.

Цей опис також стосується застосування будь-якого пептиду, що описаний тут, нуклеїнової кислоти за цим описом, вектора експресії за цим описом, клітини за цим описом, активованого Т-лімфоцита, Т-клітинного рецептора або антитіла або інших молекул, що зв'язують пептид або комплекс пептид-МНС, за цим описом як лікарського засобу або в процесі виробництва лікарського засобу. Переважно, якщо згаданий лікарський засіб виявляє протиракову активність.

Переважно, якщо згаданий лікарський засіб є засобом клітинної терапії, вакциною або білком на основі розчинного ТКР або антитілом.

50 Цей опис також стосується застосування за цим описом, де згадані ракові клітини є клітинами недрібноклітинного раку легенів, дрібноклітинного раку легенів, нирковоклітинного раку, раку головного мозку, раку шлунка, колоректального раку, гепатоцелюлярного раку, раку підшлункової залози, раку передміхурової залози, лейкозу, раку молочної залози, карциноми з клітин Меркеля, меланоми, раку яєчника, раку сечового міхура, раку матки, раку жовчного міхура і раку жовчних протоків і раку стравоходу і переважно недрібноклітинного раку легенів.

Цей опис також стосується біомаркерів на основі пептидів за цим описом, які у цьому документі іменуватимуться як "мішені", які можуть використовуватися в діагностиці раку, переважно недрібноклітинного раку легенів. Маркером може бути надмірна презентація самого(-их) пептиду(-ів) або надмірна експресія відповідного(-их) гена(-ів). Маркери також

5 можуть використовуватися для передбачення вірогідності успіху лікування, переважно імунотерапії і найбільш переважно імунотерапії, націленої на ту ж мішень, що ідентифікується біомаркером. Наприклад, антитіло або розчинний ТКР може використовуватися для барвлення зрізів пухлини з метою виявлення присутності досліджуваного пептиду у комплексі з МНС. Необов'язково, антитіло має додаткову ефекторну функцію, наприклад несе імуностимулюючий

10 домен або токсин.

Цей опис також стосується застосування цих нових мішеней для ідентифікації ТКР, які розпізнають принаймні одну зі згаданих мішеней, і переважно ідентифікації згаданих ТКР, які активують Т-клітини.

Цей опис також стосується застосування цих нових мішеней у контексті лікування раку.

15 Цей опис також стосується застосування цих пептидів за цим винаходом для отримання ТКР, індивідуальних субодиноць ТКР (поодиноці або в комбінації) та їх субдоменів, зокрема розчинних ТКР (рТКР) і клонованих ТКР, згаданих ТКР, вбудованих в аутологічні або алогенні Т-клітини, та способів їх отримання, а також інших клітин, що несуть згаданий ТКР або вступають у перехресну реакцію із згаданими ТКР.

20 Цей опис також стосується білка ТКР, індивідуальних субодиноць ТКР (поодиноці або в комбінації) та їх субдоменів, зокрема розчинних ТКР (рТКР) і клонованих ТКР, які зв'язуються з комплексом KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 1)-HLA-A*02, що містить варіабельний домен альфа-ланцюга ТКР і варіабельний домен бета-ланцюга ТКР.

Цей опис також стосується виділеної нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує ТКР за цим описом. Цей опис також стосується рекомбінантного вектора експресії, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує альфа-ланцюг ТКР, бета-ланцюг ТКР або обидва з них, отриманого за цим описом.

25

Цей опис також стосується виділеної клітини-хазяїна, що містить рекомбінантний вектор експресії, який експресує нуклеїнову кислоту, що кодує альфа-ланцюг ТКР, бета-ланцюг ТКР або обидва з них за цим описом.

30

Цей опис також стосується виділеної клітини-хазяїна, що містить рекомбінантний вектор експресії за цим винаходом, переважно якщо клітина є лімфоцитом периферичної крові (PBL)

Цей опис також стосується виділеного PBL, що містить рекомбінантний вектор експресії за цим описом, де PBL є CD8+Т-клітиною або CD4+Т-клітиною.

35

Цей опис також стосується популяції клітин, що містить принаймні одну клітину-хазяїна за цим описом.

Цей опис також стосується білків ТКР за цим описом для застосування при лікуванні проліферативних захворювань, таких як, наприклад недрібноклітинний рак легенів, дрібноклітинний рак легенів, нирковоклітинний рак, рак головного мозку, рак шлунка, колоректальний рак, гепатоцелюлярний рак, рак підшлункової залози, рак передміхурової залози, лейкоз, рак молочної залози, карцинома з клітин Меркеля, меланома, рак яєчника, рак сечового міхура, рак матки, рак жовчного міхура і рак жовчних протоків і рак стравоходу.

40

Стимуляція імунної відповіді залежить від присутності антигенів, що сприймаються імунною системою хазяїна як чужорідні. Відкриття пухлино-асоційованих антигенів зробило можливим використання імунної системи хазяїна для втручання в ріст пухлини. Зараз вивчається можливість використання для імунотерапії раку різних механізмів задіяння як гуморальної, так і клітинної ланки імунної системи.

45

Специфічні елементи клітинної імунної відповіді здатні специфічно розпізнавати та знищувати пухлинні клітини. Виділення Т-клітин із популяції пухлино-інфільтруючих клітин або з периферичної крові говорить про те, що такі клітини відіграють важливу роль у природному імунному захисті проти раку. Важливу роль у цій відповіді відіграють, зокрема, CD8-позитивні Т-клітини, які розпізнають пептиди, зв'язані з молекулами головного комплексу гістосумісності І класу (МНС). Ці пептиди зазвичай складаються з 8–10 амінокислотних залишків, що отримані з білків або дефектних рибосомальних продуктів (DRIP), які містяться у цитозолі. Молекули МНС людини також визначаються як лейкоцитарні антигени людини (HLA).

50

55

Термін "Т-клітинна відповідь" означає специфічну проліферацію та активацію ефекторних функцій, індукованих пептидом *in vitro* чи *in vivo*. Для цитотоксичних Т-клітин, обмежених МНС І класу, ефекторними функціями можуть бути лізис клітин-мішеней, оброблених пептидом чи пептидним прекурсором чи клітин-мішеней, природно презентуючих пептид, секреція цитокінів,

переважно гамма-інтерферону, TNF-альфа або ІЛ-2, індукована пептидом, секреція ефektorних молекул, переважно гранзимів чи перфоринів, індукована пептидом, або дегрануляція.

Термін "пептид" використовується в цьому описі для позначення серії амінокислотних залишків, що з'єднані один з одним зазвичай пептидним зв'язком між альфа-аміно та карбонільними групами сусідніх амінокислот. Бажано, щоб пептиди були довжиною у 9 амінокислот, але можуть бути такими короткими, як довжиною у 8 амінокислот, і такими довгими, як довжиною у 10, 11 або 12 амінокислот або більшими по довжині, а у випадку пептидів, що зв'язані з молекулами МНС II класу (подовжені варіанти пептидів за цим описом), вони можуть досягати такої довжини, як 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 або 20 або більше амінокислот.

Термін "пептид" використовується також для позначення солей серії амінокислотних залишків, що з'єднані один з одним зазвичай пептидним зв'язком між альфа-аміно та карбонільними групами сусідніх амінокислот. Переважно, щоб ці солі були фармацевтично прийнятними солями пептидів, наприклад, такими як хлорид або ацетат (трифторацетат). Треба зазначити, що солі пептидів за цим описом суттєво відрізняються від пептидів у їхньому стані(-ах) *in vivo*, оскільки пептиди не є солями *in vivo*.

Термін "пептид" повинен також включати "олігопептид". Термін "олігопептид" використовується в цьому описі для позначення серії амінокислотних залишків, що з'єднані один з одним зазвичай пептидними зв'язками між альфа-аміно та карбонільними групами сусідніх амінокислот. Довжина олігопептиду не є критичною для цього опису за умови, що він містить правильний епітоп чи епітопи. Олігопептиди зазвичай коротші, ніж довжиною близько 30 амінокислотних залишків, і довші, ніж довжиною близько 15 амінокислотних залишків.

Термін "поліпептид" використовується для позначення серії амінокислотних залишків, що з'єднані один з одним зазвичай пептидними зв'язками між альфа-аміно та карбонільними групами сусідніх амінокислот. Довжина поліпептиду не є критичною для цього опису за умови, що він містить правильні епітопи. На відміну до термінів "пептид" і "олігопептид", під терміном "поліпептид" маються на увазі молекули, що містять більш ніж приблизно 30 амінокислотних залишків.

Пептид, олігопептид, білок або полінуклеотид, що кодує таку молекулу, має назву "імуногенного" (і, отже, є "імуногеном" в межах цього опису), якщо він здатний індукувати імунну відповідь. У межах цього опису імуногенність точніше визначається як здатність викликати відповідь Т-клітин. Отже, "імуногеном" може бути молекула, яка здатна індукувати імунну відповідь, і, що стосується цього опису, молекула, що здатна індукувати відповідь Т-клітин. В іншому аспекті імуноген може бути пептидом, комплексом пептиду з МНС, олігопептидом і (або) білком, який використовується для продукції специфічних антитіл або ТКР проти нього.

"Епітоп" I класу Т-клітини потребує короткого пептиду, який зв'язаний із рецептором молекули МНС I класу, утворюючи потрійний комплекс (альфа-ланцюг молекули МНС I класу, бета-2-мікроглобулін і пептид), який може розпізнаватися Т-клітиною, що несе відповідний Т-клітинний рецептор, який зв'язується із комплексом МНС/пептид із належної афінністю. Пептиди, які зв'язані з молекулами МНС I класу, зазвичай мають довжину в 8–14 амінокислот, і, найбільш типово, довжину в 9 амінокислот.

У людини є три різні генетичні локуси, які кодують молекули МНС I класу (молекули МНС людини мають також визначаються як лейкоцитарні антигени людини (HLA)): HLA-A, HLA-B і HLA-C. HLA-A*01, HLA-A*02 і HLA-B*07 є прикладами різних алелів МНС I класу, які можуть експресуватися з цих локусів.

Таблиця 2 Частоти експресії F для HLA-A*02 і HLA-A*24 і найбільш поширених серотипів HLA-DR. Частоти, отримані з частот виявлення гаплотипів Gf серед населення США, адаптовано з публікації Mori і співавт. (Mori et al., 1997), з використанням формули Харді-Вайнберга: $F=1 - (1-Gf)^2$. Комбінація A*02 або A*24 з певними алелями HLA-DR внаслідок невірноваженого зчеплення може бути збагаченою або збідненою у порівнянні з передбачуваною на основі індивідуальних частот виявлення. Докладну інформацію див. у Chanock і співавт (Chanock et al., 2004).

Алель	Популяція	Фенотип, розрахований із частоти алелів
A*02	Європеоїдна раса (Північна Америка)	49,1 %
A*02	Афроамериканці (Північна Америка)	34,1 %
A*02	Американці монголоїдної раси (Північна Америка)	43,2 %
A*02	Латиноамериканці (Північна Америка)	48,3 %
DR1	Європеоїдна раса (Північна Америка)	19,4 %
DR2	Європеоїдна раса (Північна Америка)	28,2 %
DR3	Європеоїдна раса (Північна Америка)	20,6 %
DR4	Європеоїдна раса (Північна Америка)	30,7 %
DR5	Європеоїдна раса (Північна Америка)	23,3 %
DR6	Європеоїдна раса (Північна Америка)	26,7 %
DR7	Європеоїдна раса (Північна Америка)	24,8 %
DR8	Європеоїдна раса (Північна Америка)	5,7 %
DR9	Європеоїдна раса (Північна Америка)	2,1 %
DR1	Афроамериканці (Північна Америка)	13,20 %
DR2	Афроамериканці (Північна Америка)	29,80 %
DR3	Афроамериканці (Північна Америка)	24,80 %
DR4	Афроамериканці (Північна Америка)	11,10 %
DR5	Афроамериканці (Північна Америка)	31,10 %
DR6	Афроамериканці (Північна Америка)	33,70 %
DR7	Афроамериканці (Північна Америка)	19,20 %
DR8	Афроамериканці (Північна Америка)	12,10 %
DR9	Афроамериканці (Північна Америка)	5,80 %
DR1	Американці монголоїдної раси (Північна Америка)	6,80 %
DR2	Американці монголоїдної раси (Північна Америка)	33,80 %
DR3	Американці монголоїдної раси (Північна Америка)	9,20 %
DR4	Американці монголоїдної раси (Північна Америка)	28,60 %
DR5	Американці монголоїдної раси (Північна Америка)	30,00 %
DR6	Американці монголоїдної раси (Північна Америка)	25,10 %
DR7	Американці монголоїдної раси (Північна Америка)	13,40 %
DR8	Американці монголоїдної раси (Північна Америка)	12,70 %

DR9	Американці монголоїдної раси (Північна Америка)	18,60 %
DR1	Латиноамериканці (Північна Америка)	15,30 %
DR2	Латиноамериканці (Північна Америка)	21,20 %
DR3	Латиноамериканці (Північна Америка)	15,20 %
DR4	Латиноамериканці (Північна Америка)	36,80 %
DR5	Латиноамериканці (Північна Америка)	20,00 %
DR6	Латиноамериканці (Північна Америка)	31,10 %
DR7	Латиноамериканці (Північна Америка)	20,20 %
DR8	Латиноамериканці (Північна Америка)	18,60 %
DR9	Латиноамериканці (Північна Америка)	2,10 %
A*24	Філіппіни	65 %
A*24	Ненці Росії	61 %
A*24:02	Японія	59 %
A*24	Малайзія	58 %
A*24:02	Філіппіни	54 %
A*24	Індія	47 %
A*24	Південна Корея	40 %
A*24	Шрі-Ланка	37 %
A*24	Китай	32 %
A*24:02	Індія	29 %
A*24	Західна Австралія	22 %
A*24	США	22 %
A*24	Росія, Самара	20 %
A*24	Південна Америка	20 %
A*24	Європа	18 %

Ген MAGEA4 є членом сімейства генів MAGEA. Члени цього сімейства кодують білки з ідентичністю послідовностей одна до одної у діапазоні 50–80 % Промотори і перші екзони генів MAGEA демонструють значну варіабельність, вказуючи на те, що існування цього сімейства генів забезпечує експресію сполук з однією і тією самою функцією під різним транскрипційним контролем. Гени MAGEA утворюють кластер на ділянці хромосоми Xq28. Вони задіяні у деяких спадкових порушеннях, таких як вроджений дискератоз. У цьому гені були виявлені щонайменше чотири варіанти одного й того самого білка. [відповідно до RefSeq, Jul 2008]

MAGEA4, за описами, локалізується в цитоплазмі (Kim et al., 2015). Однак забарвлення MAGEA4 було також виявлене у ядрах, з різним розподілом між ядром і цитоплазмою для високодиференційованих ракових пухлинах у порівнянні з менш диференційованими формами раку (Sarcevic et al., 2003).

MAGEA4 використовується як маркер чоловічих статевих клітин. Він не експресується у гоноцитах, але експресується у зародкових клітинах-попередниках і зрілих статевих клітинах (Mitchell et al., 2014).

MAGEA4 є онкофетальним білком або раково-тестикулярним антигеном. Не існує чітких свідчень прямого пухлино-стимулюючого ефекту MAGEA4. Результати одного з досліджень наводять на думку, що надмірна експресія MAGEA4 прискорює ріст спонтанно трансформованих нормальних кератиноцитів ротової порожнини шляхом інгібування зупинки клітинного циклу та апоптозу (Bhan et al., 2012). Навпаки, інші звіти свідчать про пухлиносупресивний ефект MAGEA4 *in vitro*, оскільки надмірна експресія підвищує апоптоз і активність каспази-3, у той час як сайленсинг MAGE4 веде до зниження активності каспази-3 (Peikert et al., 2006). Інші автори повідомляли про те, що С-кінцевому фрагменту MAGEA4 властива проапоптотична активність *in vitro* (Sakurai et al., 2004) і що він інгібує без'якірний ріст шляхом його взаємодії з онкобілком ганкірином (Nagao et al., 2003).

Існують поодинокі випадки асоціації з метастазуванням пухлин: експресія MAGEA4 асоціювалася з метастазами у лімфатичні вузли при пласкоклітинній карциномі стравоходу (Forghanifard et al., 2011), з прогресуванням раку сечового міхура до м'язово-інвазивної форми (Bergeron et al., 2009) і з метастазами раку вульви у лімфатичний вузол (Bellati et al., 2007).

Не існує чітких свідчень асоціації MAGEA4 зі стовбуроподібними раковими клітинами. Однак експресія MAGEA4 була виявлена у клітинах побічної популяції з різних ліній ракових клітин, включаючи рак легенів, товстої кишки і молочної залози (Yamada et al., 2013), а також у зразках

пухлин лімфоми Ходжкіна (Shafer et al., 2010). Більш того, були описані випадки присутності MAGEA4 у недиференційованих ембріональних стовбурових клітинах, а також у їх диференційованих похідних, клітинах тератокарциноми (Lifantseva et al., 2011).

Надмірна експресія MAGEA4 при ракових захворюваннях — експресія MAGEA4 була описана у численних випадках різних видів раку. Докладну інформацію щодо конкретних видів раку надано у підрозділах нижче. У цьому розділі наведена лише деяка додаткова інформація стосовно тих видів раку, які не охоплені у окремому розділі, наведеному нижче.

У первинній меланомі експресію MAGEA4 виявили імуногістохімічними методами у 10–30 % пухлин і аж до 44 % віддалених метастазів (Barrow et al., 2006; Luftl et al., 2004). Первинні меланоми слизової оболонки голови та шиї виявляють до 60 % випадків позитивності щодо MAGEA4 за результатами забарвлювання (Prasad et al., 2004).

При раку сечового міхура MAGEA4 спостерігався у 38 % пухлин без інвазії у м'язову стінку, 48 % пухлин м'язово-інвазивної форми, 60 % карцином *in situ* і у 73 % метастазів у лімфатичні вузли (Bergeron et al., 2009). У іншому дослідженні описана експресія MAGEA4 при раку сечового міхура з дещо нижчою частотою, з найвищою частотою у плоскоклітинних (25 із 55, 46 %) у порівнянні з адено- (4 із 15, 27 %), саркоматоїдними (4 із 14, 29 %), дрібноклітинними (5 із 20, 25 %) карциномами або карциномами перехідних клітин (281 із 1522, 19 %) (Kocher et al., 2002). При уротеліальній карциномі експресія MAGEA4 спостерігалася, за даними імуногістохімії, у 64 % випадків і, за даними ЗТ-ПЛР, у 58% випадків (Sharma et al., 2006). Метод ЗТ-ПЛР виявив MAGEA4 у 40–60 % зразків плоскоклітинної карциноми голови та шиї (Cuffel et al., 2011; Soga et al., 2013). Експресія MAGEA4 спостерігалася у 57 % зразків плоскоклітинної карциноми порожнини рота (Montoro et al., 2012; Ries et al., 2005). Експресія MAGEA4 не була виявлена імуногістохімічними методами в жодному з 70 проаналізованих зразків доброякісних і злоякісних пухлин щитоподібної залози (Melo et al., 2011). Експресію MAGEA4 спостерігали лише у класичній семіномі, але не у несеміноматозних герміногенних пухлинах яєчка (Aubry et al., 2001; Bode et al., 2014). Експресію MAGEA4 виявили у 14 % (у 5 із 35 зразків) пухлин строми шлунково-кишкового тракту (Perez et al., 2008).

іРНК MAGEA4 була виявлена у 28 % (7 із 28) зразків дитячої медулобластоми, але імунореактивність спостерігалася лише у 4 % (1 із 25) зразків (Oba-Shinjo et al., 2008). В іншому дослідженні слабкий сигнал іРНК MAGEA4 був виявлений у 18% (2 із 11) зразків медулобластоми (Jacobs et al., 2008). В одному з досліджень було встановлено, що MAGEA4 експресується у 60% зразків Т-клітинного лейкозу/Т-клітинної лімфоми у дорослих (Nishikawa et al., 2012). В іншому звіті описана набагато нижча частота експресії у 5 % (2 із 38) зразків неходжкінської лімфоми і у 20–30% зразків хвороби Ходжкіна. При лімфомі Ходжкіна клітини Рід-Штернберга були найбільш інтенсивно забарвленими клітинами, у той час як клітини, що їх оточують, не були забарвлені (Chambost et al., 2000). Експресії MAGEA4 не було виявлено у 39 зразках множинної мієломи (Andrade et al., 2008).

Імунореактивність MAGEA4 вдалося виявити у 33% випадків плоскоклітинної карциноми шийки матки (20 із 60) (Sarcevic et al., 2003). Як було встановлено, експресія MAGEA4 спостерігалася у 12 % випадків ендометріоїдних аденокарцином, 63 % випадків папілярних серозних карцином матки і 91 % карциносарком матки, за даними імуногістохімії. Серед різних видів пухлин рівень експресії MAGEA4 був найвищим у карциносаркомах (Resnick et al., 2002). Забарвлення MAGEA4, за даними імуногістохімії, було неоднорідним, і лише частина позитивних пухлин експресує MAGEA4 у більш ніж 50% клітин пухлини (Resnick et al., 2002; Sarcevic et al., 2003). На відміну від великої кількості досліджень, у яких повідомлялося про експресію MAGEA4 при різних видах раку, свідчення про асоціацію MAGEA4 з клінічним результатом і прогнозом є більш обмеженими. Однак у деяких публікаціях знайдена кореляція рівня експресії MAGEA4 з клінічними показниками. При плоскоклітинній карциномі голови та шиї рівень експресії MAGEA4 корелював зі зниженою загальною виживаністю і являв собою незалежний прогностичний індикатор несприятливого клінічного результату (Cuffel et al., 2011). При раку сечового міхура рівень експресії MAGEA4 корелював із рецидивами і прогресуванням до м'язово-інвазивного раку (Bergeron et al., 2009), і інтенсивне забарвлення MAGEA4 асоціювалося зі зниженою виживаністю (Kocher et al., 2002). При пухлинах строми шлунково-кишкового тракту рівень експресії MAGEA4 разом із іншими раково-тестикулярними антигенами корелював з рецидивами (Perez et al., 2008), а також при раку вульви MAGEA4 частіше виявлявся у рецидивних пухлинах (Bellati et al., 2007). Свідчення асоціації рівня експресії MAGEA4 з пізніми стадіями розвитку пухлини містяться у деяких звітах, що стосуються різних видів раку: при злоякісній меланомі експресія MAGEA4 підвищувалася з розвитком захворювання з 9 % у первинних пухлинах до 44 % у віддалених метастазах (Barrow et al., 2006). При раку вульви - 23 - експресія MAGEA4 також частіше спостерігалася у пухлинах із

метастазами у лімфатичні вузли (Bellati et al., 2007). Більш того, експресія MAGEA4 асоціювалася з пухлинами високого ступеню злоякісності або з пізньою стадією при ендометріальній карциномі (Chitale et al., 2005), плоскоклітинних карциномах шийки матки (Sarcevic et al., 2003) і при раку сечового міхура (Bergeron et al., 2009; Kocher et al., 2002).

Очевидно, що MAGEA4 експресується пухлинними клітинами, не існує свідомств його експресії у стромальних, васкулярних, імунних або інших пухлиноасоційованих клітинах. Більш того, експресія MAGEA4 була також виявлена у культурах ліній пухлинних клітин, таких як лінії клітин раку шлунка (Li et al., 1997), лінії клітин карциноми стравоходу (Tanaka et al., 1997), лінії клітин карциноми підшлункової залози (Kubuschok et al., 2004) і лінії клітин плоскоклітинної карциноми голови та шиї (Hartmann et al., 2015).

Таблиця 3

MAGEA4 як загальна мішень для протиракових препаратів

Антигенні властивості	Оцінка
Надмірна експресія при [досліджуваний рак], про яку є відомості в літературі	
Надмірна експресія при інших видах раку, про яку є відомості в літературі	+
Т-клітинні відповіді на описувані мішені, отримані з білка	+
Картина експресії онкофетального антигена	+
Експресія раковими стовбуровими клітинами	(-)
Роль у проходженні клітин через клітинний цикл і у проліферації пухлинних клітин	(-)
Участь у інвазії, міграції і метастазуванні пухлин	
Зв'язок із пов'язаними з раком сигнальними шляхами ¹	
Антиапоптотичні ефекти	(-)
Проангіогенні ефекти / неоваскуляризація	
Надмірна експресія, пов'язана з несприятливим прогнозом раку	+
Надмірна експресія, що асоціюється з пізніми стадіями раку	+
Загальна мішень для протиракових препаратів	
Субклітинна локалізація ²	ЦП
Характеристики вихідного білка, літературні дані (-, +, ++, +++)	+
Асоціація з типом клітин ³	ПК

¹ TGF – трансформуючий фактор росту; PI3K – фосфатидилінозитид 3-кінази; p53 – клітинний пухлинний антиген p53; EGFR – рецептор епітеліального фактору росту; FGF2 – рецептор фактора 2 росту фібробластів; Wnt – Wnt / бета-катеніновий шлях (ембріогенез); Ras – протоонкоген саркоми щурів; NF-κB – ядерний фактор каппа В (фактор транскрипції еукаріот) ² ЦП – цитоплазматична; ³ ПК – пухлинні клітини MAGEA4 як терапевтична мішень – мішень для імунотерапії (вакцини, ад'юванти, CAR)

Двадцяти пацієнтам із поширеним раком стравоходу, шлунка або легенів вводили вакцину на основі MAGEA4, яка містить 300 мкг білка, підшкірно, раз на 2 тижні, у шести дозах. Із 15 пацієнтів, які завершили один цикл вакцинації, чотири пацієнти показали MAGEA4-специфічну гуморальну відповідь, і ці пацієнти показали довшу загальну виживаність, ніж пацієнти без відповіді антитіл. CD4 і CD8Т-клітинні відповіді спостерігалися у трьох і шести пацієнтів відповідно, і пацієнти з індукцією MAGEA4-специфічних ІФН-гамма-продукуючих CD8Т-клітин, але не CD4Т-клітин, мали довшу виживаність, ніж пацієнти без індукції (Saito et al., 2014).

Існує опис випадку захворювання на рак товстої кишки з метастазами у легені, коли хворого лікували пептидом — продуктом злиття MAGE-A4-H/K-HELP (який складається з MAGE-A4(278–299)-хелперного епітопу, з'єднаного гліциновим лінкером із MAGE-A4(143–154)-кілерним епітопом) у комбінації з ОК432 і монтанідом. Лікування індукувало MAGEA4-специфічні імунні відповіді Т-хелперів типу 1 і ЦТЛ і продукування MAGEA4-специфічного IgG. Ріст пухлини і та вміст маркера пухлини-раковомембріонального антигена знизилися, відповідно до остаточного діагнозу (Takahashi et al., 2012).

У клінічному випробуванні фази І досліджувалося адоптивне перенесення аутологічних генетично модифікованих ЦТЛ, які експресують ТКР і є реактивними відносно MAGEA4 (143–151), зв'язаних із HLA-A*24:02, у пацієнтів із раком стравоходу. Пацієнти отримували ТКР-трансдуковані лімфоцити один раз без прекодиціювання, з подальшими підшкірними імунізаціями пептидом MAGEA4 після 2 і 4 тижнів. Об'єктивної регресії пухлини не

спостерігалось, можливо, внаслідок відсутності процедури лімфодеплеції і введення ІЛ2 (Kageyama et al., 2015). Доклінічні дослідження на мишах продемонстрували, що перенесені Т-клітини інгібують ріст ліній пухлинних клітин, що експресують MAGEA4, які були прищеплені миші, і що додаткова вакцинація пептидами підвищує цю протипухлинну активність (Shirakura et al., 2012).

Націлювання на MAGEA4 шляхом адоптивного перенесення ЦТЛ пропонується як варіант лікування EBV-негативних випадків лімфоми Ходжкіна та неходжкінської лімфоми. Описувалося, що введені ЦТЛ, націлені на пептиди, отримані з EBV, індукують повну ремісію у EBV(+) пацієнтів із лімфомою. Отже, націлювання на інші антигени, які експресуються лімфомою, включаючи MAGEA4, досліджується як можливий варіант лікування (Cruz et al., 2011; Gerdemann et al., 2011).

У декількох дослідженнях було продемонстровано отримання MAGEA4- специфічних CD4(+) Т-клітин від здорових донорів і хворих на рак пацієнтів після інкубації з аутологічними антиген-презентуючими клітинами, навантаженими пулами пептидів, що перекриваються (Cesson et al., 2011; Gerdemann et al., 2011; Ohkuri et al., 2009).

MAG-003, тобто KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 1), є HLA-A*0201-рестрикованим епітопом Т-лімфоцитів (ЦТЛ), сенсibilізованих до MAGEA4 (амінокислоти 286-294) (Jia et al. 2010; Wu et al. 2011), вміст яких таким чином включений в цей документ шляхом посилання в усій повноті. В одному з аспектів, MAG-003 продукує пептид-специфічні ЦТЛ як *in vitro* із HLA-A*0201-позитивних МКПК, так і у HLA-A*0201/Kb трансгенних мишей. В іншому аспекті індуковані ЦТЛ спричиняють лізис клітин мішеней у обмежений за HLA-A*0201 спосіб, демонструючи, що MAG-003 є рестрикованим за HLA-A*0201 епітопом ЦТЛ і що він служить мішенню для терапевтичної протипухлинної вакцинації (Jia et al. 2010), вміст якої таким чином включений в цей документ шляхом посилання в усій повноті.

Крім цього, стандартна база даних SYFPEITHI (Rammensee et al., 1997; Rammensee et al., 1999) прогнозує зв'язування MAG-003 з A*02:01 з абсолютним балом 25 і відносною оцінкою 0,69. Автори цього винаходу підтвердили, що 100% ідентифікацій здійснено на основі зв'язування MAG-003 з A*02-позитивними зразками.

Таблиця 4

Презентація MAG-003 у нормальних тканинах і ракових зразках

A*02	Зразки	Середня інтенсивність	jScore
Нормальні тканини	0 із 245	---	---
Ракові зразки	14 із 397	1,1e+07	0,000
ГЦК	1 із 16	2,9e+06	0,000
МЕЛ	0 із 3	0,0e+00	
РЯ	2 із 20	4,0e+07	0,000
пНДРЛ	11 із 91	1,0e+07	0,000

Надмірна презентація або специфічна презентація ТАА на пухлинних клітинах у порівнянні з нормальними клітинами є достатньою для можливості його використання в імунотерапії, а деякі пептиди є пухлино-специфічними незважаючи на те, що їхній вихідний білок зустрічається також у нормальних тканинах. Все ж, отримання профілю експресії іРНК додає додатковий рівень безпеки у виборі пептидних мішеней для імунотерапії. Це особливо важливо для варіантів терапії з високим ризиком для безпеки, таких як ТКР із дозрілою афінністю, де ідеальний пептид буде отриманий з білка, унікального для пухлини і який не виявлений у нормальних тканинах.

Зразки тканин, видалені хірургічним шляхом, були придбані у зазначених вище джерел після одержання письмової інформованої згоди від кожного пацієнта. Зразки пухлинної тканини були миттєво заморожені безпосередньо після хірургічної операції та пізніше гомогенізовані з використанням ступки та товчача під рідким азотом. Тотальна РНК була приготована з цих зразків з використанням реактиву TRI (Ambion, Дармштадт, Німеччина), з наступним очищенням за допомогою RNeasy (QIAGEN, Хільден, Німеччина); обидві методики виконувались за протоколом виробника.

Аналіз генної експресії зразків РНК пухлинних і нормальних тканин був виконаний за методикою секвенування "наступного покоління" (RNAseq) компанією CeGaT (Тюбінген, Німеччина). Стисло, бібліотеки секвенування готують з використанням набору реагентів Illumina HiSeq v4 відповідно до протоколу виробника (Illumina Inc., Сан-Дієго, Каліфорнія, США), який включає РНК-фрагментацію, конверсію у дДНК і додавання адаптерів секвенування. Бібліотеки,

отримані із багатьох зразків, змішували у еквімолярних співвідношеннях і секвенували на секвенаторі Illumina HiSeq 2500 відповідно до інструкцій виробника, виконуючи зчитування 50 п. н. з одного кінця. Оброблені зчитування картували на геном людини (GRCh38) з використанням програми STAR. Дані з експресії отримані на рівні транскриптів у вигляді RPKM (кількість зчитувань на кілобазу, у перерахунку на мільйон картованих зчитувань, отримана за допомогою програми Cufflinks) і на рівні екзонів (загальна кількість зчитувань, отримана за допомогою програми Bedtools), на основі ідентифікації за базою даних ensembl щодо послідовностей (Ensembl77). Зчитування за ексонами нормалізують за довжиною екзону і розміром вирівнювання для отримання значень RPKM.

У Таблицях 5–7 наведені дані RNASeq (бали експресії) для експресії MAG-003 при різних видах раку.

Таблиця 5

RNASeq, бал 1

Вид пухлини	tgScore	exonScore (27242)	exonScore (317034)	exonScore (593984)
РМЗ	1,57	1,23	1,23	1,51
КРК	1,65	1,00	1,00	1,76
ГЦК	12,10	11,98	11,97	6,15
РЯ	56,60	18,45	18,44	57,74
РС	58,42	3,49	3,49	60,40
РПШЗ	12,10	10,78	10,77	4,74
пГБ	0,88	0,95	0,95	0,74
пНДРЛ	100,83	1,52	1,52	98,57
НKK	0,93	0,95	0,95	0,77
ДРЛ	56,41	28,32	28,30	152,27

Таблиця 6

RNASeq, бал 3

Вид пухлини	tgScore	exonScore (27242)	exonScore (317034)	exonScore (593984)
РМЗ	7,48	5,11	5,11	6,01
КРК	8,35	1,05	1,05	7,90
ГЦК	123,03	210,33	210,30	42,22
РЯ	612,59	333,74	333,69	447,29
РС	632,95	47,41	47,40	468,45
РПШЗ	122,95	187,07	187,05	31,15
пГБ	0,31	0,18	0,18	0,25
пНДРЛ	1100,05	10,26	10,25	768,23
НKK	0,78	0,18	0,18	0,43
ДРЛ	611,00	524,23	524,17	1190,36

Таблиця 7

Експресія на пухлині

Вид пухлини	tgtumor40	Exontumor40 (27242)	Exontumor40 (317034)	Exontumor40 (593984)
РМЗ	0,12	0,04	0,04	0,17
КРК	0,14	0,01	0,01	0,22
ГЦК	2,05	1,82	1,82	1,18
РЯ	11,19	3,16	3,16	13,72
РС	10,89	0,42	0,42	13,11
РПШЗ	2,09	1,65	1,65	0,89
пГБ	0,00	0,00	0,00	0,01
пНДРЛ	19,25	0,09	0,09	22,58
НKK	0,01	0,00	0,00	0,01
ДРЛ	10,18	4,53	4,53	33,35

На відміну від великої кількості досліджень, у яких повідомлялося про експресію MAGEA4 при різних видах раку, свідчення про асоціацію MAGEA4 з клінічним результатом і прогнозом є більш обмеженими. Однак у деяких публікаціях знайдена кореляція рівня експресії MAGEA4 з клінічними показниками. При пласкоклітинній карциномі голови та шиї рівень експресії MAGEA4 корелював зі зниженою загальною виживаністю і являв собою незалежний прогностичний індикатор несприятливого клінічного результату (Cuffel et al., 2011). Була виявлена зворотна кореляція між рівнем експресії MAGEA4 і виживанням пацієнтів при таких ракових захворюваннях на пізніх стадіях як НДРЛ (Yoshida et al., 2006; Shigematsu et al., 2010) і рак яєчника (Yakirevich et al., 2003). При раку сечового міхура рівень експресії MAGEA4 корелював із рецидивами і прогресуванням до м'язово-інвазивного раку (Bergeron et al., 2009), а інтенсивне забарвлення MAGEA4 асоціювалося зі зниженою виживаністю (Kocher et al., 2002). При пухлинах страми шлунково-кишкового тракту рівень експресії MAGEA4 разом із іншими раковотестикулярними антигенами корелював з рецидивами (Perez et al., 2008), а також при раку вульви MAGEA4 частіше виявлявся у рецидивних пухлинах (Bellati et al., 2007).

У дослідженні серозного раку яєчника високого ступеня злоякісності у межах Атласу ракового генома (TCGA) рівень експресії MAGEA8, нижчий за медіану, асоціювався з підвищенням на 11,4 місяця PFS (виживання без прогресування), це було найнадійнішим ефектом, який можна перевірити. Високий рівень експресії MAGEA8 асоціювався з гіршим PFS у пацієнтів з пухлинами з високим рівнем CD3, що потенційно свідчить про імуносупресивну роль MAGEA8, яка виникає шляхом активації імуносупресивних регуляторних клітин Treg (Eng et al., 2015).

Групи пацієнтів із раком товстої кишки з високим ризиком і низьким ризиком розрізнялися за значеннями восьми біомаркерів (ZBTB32, OR51B4, CCL8, TMEFF2, SALL3, GPSM1, MAGEA8 і SALL1), які були джерелом рекомендації з вибору індивідуального лікування (Zhang et al., 2015).

Повідомлялося, що в експериментах із клітинними лініями пласкоклітинної карциноми людини MAGEA5 і -A8 служили негативними факторами передбачення результатів лікування антитілами проти рецептора EGFR із застосуванням панітумумабу (Hartmann et al., 2014).

Свідчення асоціації рівня експресії MAGEA4 з пізніми стадіями розвитку пухлини містяться у деяких звітах, що стосуються різних видів раку: при злоякісній меланомі експресія MAGEA4 підвищувалася з розвитком захворювання з 9% у первинних пухлинах до 44% у віддалених метастазах (Barrow et al., 2006). При раку вульви експресія MAGEA4 також частіше спостерігалася у пухлинах із метастазами у лімфатичні вузли (Bellati et al., 2007). Більш того, експресія MAGEA4 асоціювалася з пухлинами високого ступеню злоякісності або з пізньою стадією при ендометріальній карциномі (Chitale et al., 2005), пласкоклітинних карциномах шийки матки (Sarcevic et al., 2003) і при раку сечового міхура (Bergeron et al., 2009; Kocher et al., 2002).

У втіленні термін "нуклеотидна послідовність" стосується гетерополімеру дезоксирибонуклеотидів.

Нуклеотидна послідовність, що кодує конкретний пептид, олігопептид або поліпептид, може зустрічатися в природі або може бути сконструйована синтетично. Загалом, сегменти ДНК, які кодують пептиди, поліпептиди та білки за цим описом, зібрані з фрагментів кДНК і коротких олігонуклеотидних лінкерів або з серії олігонулеотидів з утворенням синтетичного гена, що

здатний експресуватися в рекомбінантній транскрипційній одиниці, що містить регуляторні елементи, отримані з оперона мікроорганізму або вірусу.

Термін "нуклеотид, що кодує пептид" в контексті цього винаходу означає нуклеотидну послідовність, що кодує пептид, включаючи штучні (створені руками людини) старт- і стоп-кодони, сумісні з біологічною системою, якою ця послідовність буде експресуватися, наприклад, з дендритними клітинами або іншою системою клітин, застосованих для отримання ТКР.

Термін "нуклеотид, що кодує білок ТКР" в контексті цього винаходу означає нуклеотидну послідовність, що кодує білок ТКР, включаючи штучні (створені руками людини) старт- і стоп-кодони, сумісні з біологічною системою, якою ця послідовність буде експресуватися, наприклад, з Т-клітинами або іншою системою клітин, застосованих для отримання ТКР.

Для цілей цього винаходу посилення на послідовність нуклеїнової кислоти означає як одноланцюгову, так і дволанцюгову нуклеїнову кислоту. Отже, наприклад, для ДНК, конкретна послідовність, якщо контекст на вказує на інше, відноситься до одноланцюгової ДНК такої послідовності, дуплекса такої послідовності з її комплементом (дволанцюгова ДНК) і комплементу такої послідовності.

Термін "кодуюча ділянка" відноситься до тієї частини гена, яка або природно, або нормально кодує продукт експресії цього гена в його природному геномному оточенні, тобто до ділянки, що кодує *in vivo* природний продукт експресії гена.

Кодуюча ділянка може бути ділянкою немутованого ("нормального"), мутованого або зміненого гена, або навіть ділянкою послідовності ДНК, або гена, повністю синтезованого в лабораторії з використанням методів, добре відомих фахівцям у галузі синтезу ДНК.

Термін "продукт експресії" означає поліпептид або білок, котрий є природним трансляційним продуктом гена та будь-якої нуклеїново-кислотної послідовності, що кодує еквіваленти, які є результатом виродження генетичного коду, і, таким чином, кодує ту ж амінокислоту (ті ж амінокислоти).

Термін "фрагмент", стосовно кодуючої послідовності, означає частину ДНК, яка містить менш ніж повну кодуючу ділянку, і продукт експресії якої зберігає по суті ту ж біологічну функцію чи активність, що й продукт експресії повної кодуючої ділянки.

Термін "сегмент ДНК" відноситься до полімеру ДНК у формі окремого фрагмента чи як компонент більшої конструкції ДНК, що одержаний з ДНК, виділеної принаймні один раз по суті в чистій формі, тобто без забруднюючих ендогенних матеріалів та в кількості чи концентрації, яка дає змогу ідентифікувати, виконувати маніпуляції та відновлювати сегмент і його складові нуклеотидні послідовності за допомогою стандартних біохімічних методів, наприклад, з використанням вектора клонування. Такі сегменти надаються у формі відкритої рамки зчитування, без порушень внутрішніми нетрансльованими послідовностями, чи інтронів, які зазвичай присутні в еукаріотичних генах. Послідовності нетрансльованих ДНК можуть бути присутні за відкритою рамкою зчитування, де вони не заважають маніпуляціям або експресії кодуючих ділянок.

Термін "праймер" означає коротку нуклеїново-кислотну послідовність, котра може бути спарена з одним ланцюгом ДНК та надає вільний 3'ОН-кінець, на якому ДНК-полімераза починає синтез дезоксирибонуклеотидного ланцюга.

Термін "промотор" означає ділянку ДНК, яка бере участь у зв'язуванні РНК-полімерази для ініціації транскрипції.

Термін "виділений" означає, що матеріал видаляється зі свого первісного середовища (наприклад, природного середовища, якщо він має природне походження). Наприклад, існуючий у природі полінуклеотид чи поліпептид, присутній у живих тваринах, не є виділеним, але той самий полінуклеотид чи поліпептид, відокремлений від якихось чи всіх співіснуючих матеріалів в природній системі, є виділеним. В одному аспекті такі полінуклеотиди є часткою вектора, і (або) такі полінуклеотиди чи поліпептиди є частиною композиції і все ж таки є виділеними, якщо такий вектор чи композиція не є частиною свого природного середовища.

Ці полінуклеотиди та рекомбінантні чи імуногенні поліпептиди, розкриті відповідно до цього опису, також можуть бути в "очищеній" формі. Термін "очищений" не вимагає абсолютної чистоти; скоріше він має відносне значення та може включати препарати високого ступеню очищення або препарати, які тільки частково очищені, в тому сенсі, як спеціалісти в цій галузі розуміють такі терміни. Наприклад, окремі клони, виділені з бібліотеки кДНК, були стандартним чином очищені до електрофоретичної однорідності. Очищення вихідного матеріалу чи природного матеріалу принаймні на порядок величини, переважно на два-три порядки, та більш переважно, на чотири-п'ять порядків величини, чітко передбачається в цьому винаході. Крім того, заявлений поліпептид, який має чистоту переважно 99,999, або принаймні 99,99 % чи 99,9 % і навіть бажано 99 % за масою чи більше, також чітко пропонується у винаході.

Нуклеїнові кислоти та поліпептиди як продукти експресії, що розкриваються відповідно до цього опису, а також вектори експресії, які містять такі нуклеїнові кислоти і (або) такі поліпептиди, можуть бути в "збагаченій формі". Термін "збагачений" в тому виді, в якому він використовується тут, означає, що концентрація матеріалу принаймні приблизно в 2, 5, 10, 100 або 1000 разів перевищує його природну концентрацію (наприклад), бажано 0,01 %, за масою, принаймні краще приблизно 0,1 % за масою. Також мають на увазі збагачені препарати приблизно в 0,5 %, 1 %, 5 %, 10 % та 20 % за масою. Послідовності, конструкції, вектори, клони та інші матеріали, які включені у цей опис, можуть, що більш сприятливо, бути у збагаченій чи виділеній формі. Термін "активний фрагмент" означає фрагмент, зазвичай пептиду, поліпептиду або нуклеїново-кислотної послідовності, що генерує імунну реакцію (тобто має імуногенну активність) при введенні індивідуально чи, необов'язково, з прийнятим ад'ювантом або у векторі, тварині, наприклад, ссавцю, такому як кролик чи миша, і також включаючи людину, до того ж така імунна реакція має вид стимуляції Т-клітинної відповіді у тварини-реципієнта, такої як людина. Альтернативно, "активний фрагмент" також може використовуватись для індукції Т-клітинної відповіді *in vitro*.

В цьому винаході терміни "частка", "сегмент" і "фрагмент", якщо вони використовуються по відношенню до поліпептидів, означають безперервну послідовність залишків, таких як амінокислотні залишки, причому ця послідовність утворює підгрупу більшої послідовності. Наприклад, якщо поліпептид був підданий обробці будь-якою з типових ендопептидаз, таких як трипсин або хімотрипсин, олігопептиди, одержані в результаті такої обробки, будуть представляти частки, сегменти чи фрагменти початкового поліпептиду. Якщо такі терміни використовуються стосовно полінуклеотидів, вони означають продукти, одержані після обробки згаданих полінуклеотидів будь-якою з типових ендонуклеаз.

Відповідно до цього опису, термін "відсоткова ідентичність" або "відсоток ідентичності" відносно послідовності означає, що послідовність порівнюється із заявленою або описаною послідовністю після вирівнювання послідовності, яка порівнюється ("Послідовність, що порівнюється"), з описаною або заявленою послідовністю ("Контрольна послідовність"). Відсоткова ідентичність визначається відповідно до наведеної нижче формули:

$$\text{Відсоткова ідентичність} = 100 [1 - (C/R)]$$

де С - кількість відмінностей між Контрольною послідовністю та Послідовністю, що порівнюється, на довжині вирівнювання між Контрольною послідовністю та Послідовністю, що порівнюється, де

(i) кожна основа чи амінокислота в Контрольній послідовності, котра не має відповідної вирівняної основи чи амінокислоти у Послідовності, що порівнюється, і

(ii) кожний розрив у Контрольній послідовності та

(iii) кожна вирівняна основа чи амінокислота в Контрольній послідовності, котра не має відповідної вирівняної основи чи амінокислоти у Послідовності, що порівнюється, становить відмінність, і

(iv) вирівнювання повинне починатися з позиції 1 вирівняних послідовностей;

і R є числом основ або амінокислот у Контрольній послідовності по довжині вирівнювання з Послідовністю, що порівнюється, причому будь-який розрив, створений у Контрольній послідовності, також вважається основою або амінокислотою.

Якщо існує вирівнювання між Послідовністю, що порівнюється, та Контрольною послідовністю, для якої відсоткова ідентичність, що розрахована вище, є приблизно рівною чи більшою, ніж зазначена мінімальна Відсоткова ідентичність, то Послідовність, що порівнюється, має зазначену мінімальну відсоткову ідентичність до Контрольної послідовності, хоча можуть існувати вирівнювання, в яких розрахована, як описано вище, Відсоткова ідентичність є меншою, ніж зазначена Відсоткова ідентичність.

Як згадано вище, таким чином, цей опис стосується пептиду, що містить послідовність, вибрану з групи від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 24, або варіанту його послідовності, який на 85 % гомологічний послідовності від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 24, або його варіанту, який індукує перехресну реакцію Т-клітин зі згаданим пептидом. Пептиди за описом здатні зв'язуватися з молекулою головного комплексу гістосумісності (МНС) людини I класу, або подовжені версії згаданих пептидів – з молекулою II класу.

У цьому описі термін "гомологічний" означає ступінь ідентичності (див. "Відсоткова ідентичність" вище) послідовностей двох амінокислотних послідовностей, тобто пептидних або поліпептидних послідовностей. Згадана вище "гомологія" визначається порівнянням двох послідовностей, що були вирівняні в оптимальних умовах щодо послідовностей, які порівнюються. Таку гомологічність послідовностей можна розрахувати, створивши вирівнювання за допомогою, наприклад, алгоритму ClustalW. Загальнодоступне програмне

забезпечення для аналізу послідовностей, більш конкретно, Vector NTI, GENETYX або інші інструменти можна знайти у базах даних у вільному доступі.

Фахівець у цій галузі в змозі оцінити, чи будуть Т-клітини, індуковані варіантом конкретного пептиду, вступати в перехресну реакцію із самим пептидом (Appay et al., 2006; Colombetti et al., 2006; Fong et al., 2001; Zaremba et al., 1997).

Під терміном "варіант" даної амінокислотної послідовності автори винаходу мають на увазі, що бокові ланцюги, наприклад, одного чи двох амінокислотних залишків змінюються (зокрема, шляхом заміни їх боковим ланцюгом іншого природно існуючого амінокислотного залишку чи якимось іншим боковим ланцюгом) таким чином, що пептид все ще здатний зв'язуватися з молекулою HLA, по суті, у такий же спосіб, як і пептид, що складається з даної амінокислотної послідовності від SEQ ID NO:1 до SEQ ID NO:24. Наприклад, пептид може бути модифікований так, що він буде принаймні зберігати, чи навіть поліпшувати здатність взаємодіяти та зв'язуватися зі зв'язувальною щільною прийнятною молекулою MHC, такої як HLA-A*02 або -DR, і у такий спосіб принаймні зберігати чи навіть поліпшувати здатність зв'язуватися з ТКР активованих Т-клітин. Аналогічно, білок ТКР може бути модифікований так, що він буде принаймні зберігати, чи навіть поліпшувати здатність взаємодіяти та зв'язуватися з прийнятним комплексом молекула MHC (така як HLA-A*02 або -DR)/KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 1), і у такий спосіб принаймні зберігати чи навіть поліпшувати здатність активувати Т-клітини.

Ці Т-клітини можуть згодом вступати в перехресну реакцію із клітинами і знищувати клітини, які експресують поліпептид, що містить природну амінокислотну послідовність спорідненого пептиду, такого як KVLEHVVRV (SEQ ID NO:1), як визначено в аспектах цього опису. Як можна дізнатися з наукових публікацій і баз даних (Rammensee et al., 1999; Godkin et al., 1997), окремі позиції пептидів, що зв'язують HLA, є типово якірними залишками, які формують ключову послідовність, що відповідає зв'язувальному мотиву рецептора HLA, який визначається полярністю, електрофізичними, гідрофобними властивостями і просторовою структурою поліпептидних ланцюгів, що утворюють зв'язувальну щільну. Отже, фахівець у цій галузі зможе модифікувати амінокислотні послідовності від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 24, зберігаючи відомі якірні залишки, і буде здатний визначити, чи зберігають такі варіанти здатність зв'язувати комплекси молекули MHC I або II класу/KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 1). Варіанти цього опису зберігають здатність зв'язувати комплекси молекули MHC I або II класу/KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 1). Т-клітини, які експресують варіанти за цим описом, можуть згодом знищувати клітини, які експресують поліпептид, що містить природну амінокислотну послідовність спорідненого пептиду, такого як KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 1).

Первісні (немодифіковані) пептиди або білки ТКР, що розкриваються в цьому документі, можуть модифікуватися заміщенням одного чи кількох залишків на різних, можливо, селективних, ділянках пептидного ланцюга, якщо не зазначено інакше. Переважно, щоб ці заміщення знаходилися на кінці амінокислотного ланцюга згаданого пептиду. У випадку білків ТКР переважно, щоб ці заміщення знаходилися у варіабельних доменах альфа-ланцюга ТКР і бета-ланцюга ТКР. Такі заміщення можуть бути консервативного характеру, наприклад, коли одна амінокислота замінюється амінокислотою подібної структури та характеристик, наприклад, коли гідрофобна амінокислота замінюється іншою гідрофобною амінокислотою. Навіть більш консервативною буде заміна амінокислот такого ж чи подібного розміру та хімічного характеру, наприклад, коли лейцин замінюється на ізолейцин. В дослідженнях варіацій послідовностей в сімействах природних гомологічних білків певні амінокислотні заміщення допускаються частіше, ніж інші, і вони часто демонструють кореляцію зі схожістю за розміром, зарядом, полярністю та гідрофобністю між первісною амінокислотою та її заміною, і це є основою для визначення "консервативних заміщень".

Консервативні заміщення визначаються в цьому документі як обмін в межах однієї з наведених нижче п'яти груп: група 1 – малі аліфатичні, неполярні чи слабо полярні залишки (Ala, Ser, Thr, Pro, Gly); група 2 – полярні, негативно заряджені залишки та їх аміді (Asp, Asn, Glu, Gln); група 3 – полярні, позитивно заряджені залишки (His, Arg, Lys); група 4 – великі аліфатичні неполярні залишки (Met, Leu, Ile, Val, Cys); та група 5 – великі ароматичні залишки (Phe, Tyr, Trp).

Менш консервативні заміщення можуть включати заміну однієї амінокислоти іншою, яка має подібні характеристики, але дещо відрізняється за розміром, наприклад, заміна аланіну залишком ізолейцину. Високо-неконсервативні заміни можуть включати заміщення кислотої амінокислоти полярною, або навіть такою, що є основною за своїм характером. Такі "радикальні" заміщення не можуть, однак, відхилятися як потенційно неефективні, оскільки їх хімічні наслідки не є повністю прогнозованими, та радикальні заміщення також можуть

несподівано призвести до сприятливих ефектів, які неможливо передбачити за простими хімічними принципами.

Звичайно, такі заміщення можуть включати структури, що відрізняються від звичайних L-амінокислот. Отже, D-амінокислоти можуть заміщуватися L-амінокислотами, котрі зазвичай виявляються в антигенних пептидах цього опису та все ж охоплюються розкриттям в ньому. Крім того, нестандартні амінокислоти (тобто інші, ніж стандартні амінокислоти природних білків), також можуть використовуватись для заміщення з метою отримання імуногенів та імуногенних поліпептидів відповідно до цього опису.

Якщо виявляється, що заміщення в більш ніж одній позиції приводять до утворення пептиду по суті з еквівалентною чи більшою антигенною активністю, як визначено нижче, тоді комбінації цих заміщень будуть досліджуватись з метою визначення, чи мають комбіновані заміщення додатковий чи синергічний вплив на антигенність пептиду. Як правило, в пептиді замінюються одночасно не більш ніж 4 позиції.

Пептид, що по суті складається з амінокислотної послідовності як зазначено у цьому документі, може мати одну або дві неякірні амінокислоти (див. нижче пояснення щодо якірного мотиву), що були замінені без того, щоб здатність пептиду зв'язуватись з молекулою головного комплексу гістосумісності (МНС) людини I або II класу суттєво змінилася або піддалася негативному впливу у порівнянні з немодифікованим пептидом. У іншому втіленні, у пептиді, що складається або по суті складається з цієї амінокислотної послідовності як зазначено у цьому документі, одна або дві амінокислоти можуть бути замінені партнерами по консервативній заміні (також див. нижче у цьому документі) без того, щоб здатність пептиду зв'язуватись з молекулою головного комплексу гістосумісності (МНС) людини I або II класу суттєво змінилася або піддалася негативному впливу у порівнянні з немодифікованим пептидом.

Ті амінокислотні залишки, що не є суттєвими для взаємодії з ТКР, можуть бути модифіковані шляхом заміни іншою амінокислотою, введення якої не має суттєвого впливу на реактивність Т-клітин та не виключає зв'язування із відповідним МНС. Отже, за винятком зазначеної умови, пептид за описом може бути будь-яким пептидом (до цього терміну автори винаходу відносять олігопептид чи поліпептид), який включає амінокислотні послідовності або їхню частину чи її варіант, як він є.

Таблиця 9

Варіанти пептидів за цим винаходом

Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO:1-13	K	V	L	E	H	V	V	R	V
Варіанти	Y	L							
	Y	L							L
	Y	L							A
	Y	L							I
	Y	A							
	Y	A							L
	Y	A							A
	Y	A							I
	Y								
	Y								L
	Y								A
	Y								I

Більш довгі (подовжені) пептиди також можуть бути придатними. Можливо, що хоча зазвичай фактичні епітопи є залишками, які не мають значного впливу на протеолітичне розщеплення, епітопи МНС I класу необхідні для презентації фактичного епітопу під час процесингу.

Пептиди за цим описом можуть бути подовжені на сегмент довжиною аж до чотирьох амінокислот, тобто 1, 2, 3 або 4 амінокислоти можуть бути додані до будь-якого кінця у будь-якій комбінації, довжиною від 8 до 11 амінокислот, і їх утворюють шляхом процесингу з більш довгих пептидів чи білків, які включають фактичний епітоп. Бажано, щоби бокові залишки були у співвідношенні між 4:0 і 0:4. Комбінації подовжень за цим описом можуть бути проілюстровані у Таблиці 10.

Таблиця 10

Комбінації подовжень у пептидах за цим описом

С-кінець	N-кінець
4	0
3	0 або 1
2	0, або 1, або 2
1	0, або 1, або 2, або 3
0	0, або 1, або 2, або 3, або 4
N-кінець	С-кінець
4	0
3	0 або 1
2	0, або 1, або 2
1	0, або 1, або 2, або 3
0	0, або 1, або 2, або 3, або 4

Амінокислотами для подовжень/елонгацій можуть бути пептиди вихідної послідовності білка або будь-яка інша амінокислота. Подовження може використовуватися для підвищення стабільності або розчинності пептидів.

- 5 Отже, епітопи відповідно цього опису можуть бути ідентичними природним пухлино-асоційованим та пухлино-специфічним епітопам або можуть включати епітопи, які відрізняються не більше ніж на чотири залишки від контрольного пептиду, за умови, що вони мають по суті ідентичну антигенну активність.

- 10 У альтернативному втіленні пептид є подовженим з будь-якого або з обох боків на більш ніж 4 амінокислоти, переважно до загальної довжини аж до 30 амінокислот. Це може привести до утворення пептидів, що зв'язуються з молекулами МНС II класу. Зв'язування з молекулами МНС II класу може бути перевірено методами, відомими в цій галузі.

- 15 Відповідно, за цим описом також пропонуються пептидні епітопи і епітопи пептидних варіантів, що зв'язуються з молекулами МНС I класу, де згаданий пептид або його варіант має загальну довжину від 8 до 100, переважно від 8 до 30, та найбільш переважно від 8 до 14, а саме 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 амінокислот, а у випадку подовжених пептидів, що зв'язуються з молекулами HLA II класу, вони можуть також досягати довжини 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 або 22 амінокислоти.

- 20 Зрозуміло, що пептид або його варіант за цим описом здатний зв'язуватися з молекулою головного комплексу гістосумісності (МНС) людини I або II класу. Зв'язування пептиду або його варіанта з комплексом МНС може бути досліджено методами, відомими в цій галузі.

- 25 Переважно, коли Т-клітини, специфічні по відношенню до пептиду за цим описом, досліджують у порівнянні із заміщеними пептидами, причому концентрація пептиду, за якої заміщені пептиди досягають половини максимального росту лізису відносно фонових значень, є не більше ніж 1 мМ, переважно не більше ніж 1 мкМ, ще більш переважно не більше ніж приблизно 1 нМ, і ще більш переважно не більше ніж приблизно 100 пМ, і найбільш переважно не більше ніж приблизно 10 пМ. Переважно також, щоб заміщений пептид розпізнавався Т-клітинами, отриманими від більш ніж однієї особи, принаймні двох, і більш переважно трьох осіб.

- 30 Підсилення афінності пухлино-специфічних ТКР та її застосування ґрунтується на існуванні "вікна" для оптимальної афінності ТКР. Існування такого вікна базується на спостереженнях, що ТКР, специфічні до патогенів, рестрикованих за молекулами HLA-A2, мають значення KD, які, як правило, приблизно у 10 разів нижчі, якщо їх порівняти з ТКР, специфічних до "своїх" власних антигенів (аутоантигенів), рестрикованих за молекулами HLA-A2 (Aleksic et al. 2012; Kunert et al. 2013). Зараз відомо, що хоча пухлинні антигени мають потенціал ставати імуногенними, оскільки пухлини виникають із власних клітин індивідуума, тільки мутовані білки або білки зі зміненою трансляційною модифікацією будуть сприйматися імунною системою як чужорідні. Антигени, які мають підвищену активність або надмірно експресуються (так звані аутоантигени), зовсім необов'язково викликають функціональну імунну відповідь на пухлину. Т-клітини, що експресують ТКР, які є високоактивними по відношенню до цих антигенів, будуть піддаватися негативному відбору у тимусі у процесі, відомому як центральна толерантність (Xing et al. 2012; Ruella et al. 2014; Sharpe et al. 2015), що означає, що залишаться лише Т-клітини з низькоафінними ТКР до аутоантигенів. Таким чином, афінність ТКР або їх варіантів за цим

описом до MAG-003 була підвищена методами, добре відомими фахівцям у цій галузі, як описано нижче.

"Фармацевтична композиція" є переважно композицією, прийнятною для введення людині у медичній установі. Переважно, фармацевтична композиція є стерильною і виробляється відповідно до вимог належної виробничої практики (GMP).

Фармацевтичні композиції включають пептиди або білки ТКР або у вільній формі, або у формі фармацевтично прийнятої солі (див. також вище). Термін "фармацевтично прийнята сіль" в контексті цього винаходу означає похідну сполуку розкритих пептидів, в якій пептид модифікується шляхом створення кислоти чи основної солі речовини. Наприклад, кислі солі готуються з вільної основи (як правило, де нейтральна форма лікарського засобу має нейтральну $-NH_2$ -групу), за участю реакції з прийнятною кислотою. Прийнятні кислоти для приготування кислих солей включають органічні кислоти, такі, наприклад, як оцтова кислота, пропіонова кислота, гліколева кислота, піровиноградна кислота, щавлева кислота, яблучна кислота, малінова кислота, бурштинова кислота, малеїнова кислота, фумарова кислота, винна кислота, лимонна кислота, бензойна кислота, корична кислота, мигдальна кислота, метансульфокислота, етансульфокислота, п-толуолсульфокислота, саліцилова кислота і т. ін., а також неорганічні кислоти, наприклад, соляна кислота, бромистоводнева кислота, сірчана кислота, азотна кислота, фосфорна кислота і т. ін. І навпаки, приготування основних солей кислотних компонентів, які можуть бути присутніми на пептиді, здійснюється з використанням фармацевтично прийнятої основи, такої як гідроксид натрію, гідроксид калію, гідроксид амонію, гідроксид кальцію, триметиламін і тому подібні.

Інше втілення цього винаходу стосується пептиду неприродного походження, де згаданий пептид складається або по суті складається з амінокислотної послідовності від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 24 і був отриманий синтезом (наприклад, синтезований) у вигляді фармацевтично прийнятої солі. Способи синтетичного отримання пептидів добре відомі фахівцю у цій галузі. Солі пептидів за цим винаходом суттєво відрізняються від пептидів за їхнім станом (їхніми станами) *in vivo*, оскільки пептиди, які генеруються *in vivo*, не є солями. Сольова форма пептиду неприродного походження опосередковує розчинність цього пептиду, особливо у контексті фармацевтичних композицій, які містять ці пептиди, наприклад, пептидні вакцини, як це розкрито тут. Достатня і принаймні суттєва розчинність пептиду (пептидів) є необхідною умовою для того, щоб ефективно доставити пептиди суб'єкту, якого належить лікувати. Переважно, щоб ці солі були фармацевтично прийнятними солями пептидів. Ці солі за винаходом включають лужні і лужноземельні солі, такі як солі із серії Гофмейстера, які містять аніони PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , CH_3COO^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , ClO_4^- , I^- , SCN^- і катіони NH_4^+ , Rb^+ , K^+ , Na^+ , Cs^+ , Li^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} і Ba^{2+} . Зокрема, солі вибирають із $(NH_4)_3PO_4$, $(NH_4)_2HPO_4$, $(NH_4)H_2PO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, NH_4CH_3COO , NH_4Cl , NH_4Br , NH_4NO_3 , NH_4ClO_4 , NH_4I , NH_4SCN , Rb_3PO_4 , Rb_2HPO_4 , RbH_2PO_4 , Rb_2SO_4 , Rb_4CH_3COO , Rb_4Cl , Rb_4Br , Rb_4NO_3 , Rb_4ClO_4 , Rb_4I , Rb_4SCN , K_3PO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , K_2SO_4 , KCH_3COO , KCl , KBr , KNO_3 , $KClO_4$, KI , $KSCN$, Na_3PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , Na_2SO_4 , $NaCH_3COO$, $NaCl$, $NaBr$, $NaNO_3$, $NaClO_4$, NaI , $NaSCN$, $ZnCl_2$, Cs_3PO_4 , Cs_2HPO_4 , CsH_2PO_4 , Cs_2SO_4 , $CsCH_3COO$, $CsCl$, $CsBr$, $CsNO_3$, $CsClO_4$, CsI , $CsSCN$, Li_3PO_4 , Li_2HPO_4 , LiH_2PO_4 , Li_2SO_4 , $LiCH_3COO$, $LiCl$, $LiBr$, $LiNO_3$, $LiClO_4$, LiI , $LiSCN$, Mg_2SO_4 , $Mg_3(PO_4)_2$, Mg_2HPO_4 , $Mg(H_2PO_4)_2$, Mg_2SO_4 , $Mg(CH_3COO)_2$, $MgCl_2$, $MgBr_2$, $Mg(NO_3)_2$, $Mg(ClO_4)_2$, MgI_2 , $Mg(SCN)_2$, $MnCl_2$, $Ca_3(PO_4)_2$, Ca_2HPO_4 , $Ca(H_2PO_4)_2$, $CaSO_4$, $Ca(CH_3COO)_2$, $CaCl_2$, $CaBr_2$, $Ca(NO_3)_2$, $Ca(ClO_4)_2$, CaI_2 , $Ca(SCN)_2$, $Ba_3(PO_4)_2$, Ba_2HPO_4 , $Ba(H_2PO_4)_2$, $BaSO_4$, $Ba(CH_3COO)_2$, $BaCl_2$, $BaBr_2$, $Ba(NO_3)_2$, $Ba(ClO_4)_2$, BaI_2 і $Ba(SCN)_2$. Особливо переважними є ацетат NH_4 , $MgCl_2$, KH_2PO_4 , Na_2SO_4 , KCl , $NaCl$ і $CaCl_2$, такі як, наприклад, хлоридні або ацетатні (трифторацетатні) солі.

В особливо переважному втіленні фармацевтичні композиції містять пептиди або білки ТКР у вигляді солей оцтової кислоти (ацетати), трифторацетатів або солей соляної кислоти (хлориди).

Згідно з ще одним аспектом опису пропонується нуклеїнова кислота (наприклад, полінуклеотид), що кодує пептид чи його варіант і білок ТКР і варіанти ТКР за описом. Полінуклеотид може бути, наприклад, ДНК, кДНК, ПНК, СНК, РНК чи їх комбінацією, як одноланцюговою, так і (або) дволанцюговою, або природними чи стабілізованими формами полінуклеотидів, такими як, наприклад, полінуклеотиди з фосфоротіоатним скелетом; він може містити або не містити інтрони, за умови, що він кодує пептид. Звичайно, що тільки пептиди, що містять природно існуючі амінокислотні залишки, з'єднані природно існуючими пептидними зв'язками, можуть бути кодовані полінуклеотидом. Згідно з ще одним аспектом цього опису, пропонується вектор експресії, здатний експресувати поліпептид відповідно до опису.

Було розроблено багато способів зв'язування полінуклеотидів, особливо ДНК, з векторами, наприклад, за допомогою комплементарних липких кінців. Наприклад, можуть бути додані

комплементарні гомополімерні хвости до сегменту ДНК, щоб бути вставленими у вектор ДНК. Цей вектор і сегмент ДНК потім з'єднують водневим зв'язком між комплементарними гомополімерними хвостами з утворенням молекул рекомбінантної ДНК.

5 Синтетичні лінкери, що містять один або більше сайтів рестрикції, забезпечують альтернативний спосіб об'єднання фрагментів ДНК у вектори. Синтетичні лінкери, що містять різноманітні сайти впізнавання рестрикційних ендонуклеаз, комерційно доступні у декількох джерелах, включаючи компанію International Biotechnologies Inc., Нью Хейвен, Коннектикут, США.

10 У бажаному методі модифікації ДНК, що кодує поліпептид за описом, використовується полімеразна ланцюгова реакція, як це розкрито у роботі Saiki RK, et al. (Saiki et al., 1988). Цей метод може використовуватися для введення цієї ДНК у відповідний вектор, наприклад, шляхом створення відповідних сайтів рестрикції, або його можна застосовувати для модифікації ДНК у інший прийнятний спосіб, відомий фахівцям у цій галузі. Якщо використовуються вірусні вектори, переважними є вектори на основі поксвірусу або аденовірусу.

15 Ця ДНК (або, у випадку ретровірусного вектора, РНК) може потім експресуватися у відповідному організмі-хазяїні, утворюючи поліпептид, що містить пептид або чи його варіант за описом. Таким чином, ДНК, яка кодує пептид чи його варіант за описом, може використовуватися відповідно до відомих методик, належним чином модифікованих виходячи з ідей, розкритих у цьому описі, для конструювання вектора експресії, який після цього використовується для трансформації відповідних клітин-хазяїв таким чином, щоб вони набули здатності експресувати і виробляти пептиди за описом. Ці методики включають такі, що розкриті, наприклад, у патентах США 4 440 859, 4 530 901, 4 582 800, 4 677 063, 4 678 751, 4 704 362, 4 710 463, 4 757 006, 4 766 075 і 4 810 648.

20 Ця ДНК (або, у випадку ретровірусного вектора, РНК), яка кодує поліпептид, що є предметом цього опису, може бути з'єднана з широким спектром інших послідовностей ДНК для введення у відповідну клітину-хазяїна. Ця супутня ДНК буде залежати від природи хазяїна, способу представлення ДНК хазяїну, і від того, необхідне утримання в епісомальній чи інтегрованій формі.

Зазвичай ДНК вставляється у вектор експресії, такий як плазміда, у належній орієнтації і коректній рамці зчитування для експресії. Якщо необхідно, ДНК може бути зв'язаною з відповідними нуклеотидними послідовностями, що забезпечують координацію транскрипції і трансляції, що розпізнаються бажаним хазяїном, хоча такі контрольні елементи зазвичай містяться у векторі експресії. Вектор згодом вводиться хазяїну із використанням стандартних методик. Загалом, не всі хазяї трансформуються вектором. Отже, необхідно виділити трансформовані клітини-хазяї. Одна з методик виділення включає введення до складу вектора експресії такої послідовності ДНК із будь-якими необхідними контрольними елементами, яка кодує вибрану ознаку у трансформованій клітині, таку як резистентність до антибіотиків.

35 Як альтернатива, ген для такої вибраної ознаки може бути вбудованим в інший вектор, який використовується для спільної трансформації бажаної клітини-хазяїна.

40 Клітини-хазяї, які були трансформовані рекомбінантною РНК за описом, потім культивують протягом достатнього періоду часу у відповідних умовах, які відомі фахівцям у цій галузі з точки зору ідей, розкритих тут, з метою дати можливість експресувати поліпептид, який потім може бути виділений.

45 Фахівцям відомі багато експресійних систем, включаючи бактерії (наприклад, *E. coli* і *Bacillus subtilis*), дріжджі (наприклад, *Saccharomyces cerevisiae*), міцеліальні гриби (наприклад, *Aspergillus* spec.), клітини рослин, тварин і комах. Переважно, система може бути клітинами ссавців, таких як клітини CHO, які комерційно доступні від Американської колекції типових культур ATCC.

Типова векторна плазміда клітин ссавців для конститутивної експресії включає вірус CMV або промотор SV40 з відповідним поліаденільним хвостом poly(A)-tail і маркером резистентності, таким є неоміцин. Одним із прикладів є pSVL, доступний від компанії Pharmacia, Піскатеуей, Нью-Джерсі, США. Прикладом вектора індукційної експресії у ссавців є pMSG, також доступний від компанії Pharmacia. Корисними є плазмідні вектори дріжджів pRS403-406 і pRS413-416, які доступні від компанії Stratagene Cloning Systems, Ла Джола, Каліфорнія 92037, США. Плазмідні pRS403, pRS404, pRS405 і pRS406 є дріжджовими інтегруючими плазмідами (YIp) і включають дріжджові селективні маркери HIS3, TRP1, LEU2 і URA3. Плазмідні pRS413-416 є дріжджовими плазмідами з центромерами (Ycp). Вектори на базі промотору CMV (наприклад, від компанії Sigma-Aldrich) забезпечують тимчасову або стабільну експресію, цитоплазматичну експресію або секрецію і N-термінальне або C-термінальне мічення для різних комбінацій FLAG, 3xFLAG, с-тус або MAT. Ці злиті білки можна використовувати для

виявлення, очищення і аналізу рекомбінантного білка. Злиття з використанням двох міток забезпечує гнучкість під час виявлення.

Сильна регуляторна область промотора цитомегаловірусу (CMV) людини підвищує рівні конститутивної експресії білка у клітинах лінії COS до таких високих значень, як 1 мг/л. У разі не таких активних ліній клітин рівні білка зазвичай становлять ~0,1 мг/л. Присутність ділянки початку реплікації у фрагменті SV40 приводить до високих рівнів реплікації ДНК у пермісивних клітинах COS. Вектори CMV, наприклад, можуть містити рMB1 (похідне рBR322) ділянку початку реплікації у клітинах бактерій, ген бета-лактамази для вибору резистентності бактерій до ампіциліну, poly(A) гормону росту людини і ділянку початку реплікації f1. Вектори, що містять лідерну послідовність препротрипсину (PPT), можуть направляти секрецію злитих білків FLAG в культуральному середовищі на очищення антитіл проти FLAG, смол і планшетів. Інші вектори і експресійні системи також добре відомі у цій галузі для використання у багатьох клітинах-хазяїнах.

В іншому втіленні два або більше пептидів або варіантів пептидів за описом кодуються і, отже, експресуються послідовно (подібно до конструкцій "вузли на мотузці"). При цьому пептиди або варіанти пептидів можуть бути зв'язані або злиті одне з одним фрагментами лінкерних амінокислотних послідовностей, такими, наприклад, як LLLLLL, або можуть зв'язатися без будь-яких додаткових пептидів між ними. Ці конструкції можуть також застосовуватися для терапії раку і можуть індукувати імунну відповідь за участі як молекул МНС I класу, так і МНС II класу.

Цей опис також стосується клітини-хазяїна, трансформованої полінуклеотидною векторною конструкцією за описом. Клітина-хазяїн може бути або прокаріотичною, або еукаріотичною. Бактеріальні клітини можуть бути переважно прокаріотичними клітинами-хазяїнами у деяких обставинах, а зазвичай це штам *E. coli*, такий як, наприклад, штам DH5 *E. coli*, доступний від компанії Bethesda Research Laboratories Inc., Бетесда, Меріленд, США, і RR1, доступний від Американської колекції типових культур ATCC, Роквіл, Меріленд, США (Номер ATCC 31343). Переважні еукаріотичні клітини-хазяї включають клітини дріжджів, комах і ссавців, переважно клітини хребетних, такі як лінії фібробластів і клітин товстої кишки від мишей, пацюків, мавп або людини. Дріжджові клітини-хазяї включають YPH499, YPH500 і YPH501, які зазвичай доступні від компанії Stratagene Cloning Systems, Ла Джола, 92037, Каліфорнія, США. Переважні клітини-хазяї ссавців включають клітини яєчника китайського хом'яка (CHO), доступні як штам ATCC CCL61, клітини ембріонів швейцарської миші штаму NIH/3T3, доступні з колекції ATCC CRL 1658, клітини COS-1 з нирок мавп, доступні з колекції ATCC CRL 1650 і клітини 293 нирок ембріонів людини. Переважними клітинами комах є клітини Sf9, що можуть бути трансфектовані бакуловірусними векторами експресії. Огляд публікацій щодо вибору відповідних клітин-хазяїв для експресії можна знайти, наприклад, у підручнику: Paulina Balbás and Argelia Lorence "Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols," Part One, Second Edition, ISBN 978-1-58829-262-9, і інших літературних джерелах, відомих фахівцю у цій галузі.

Трансформація відповідних клітин-хазяїв за допомогою ДНК-конструкції за цим описом здійснюється добре відомими методами, вибір яких, як правило, залежить від типу вектора, що використовується. Щодо трансформації прокаріотичних клітин-хазяїв див., наприклад, Cohen et al. (Cohen et al., 1972) і (Green and Sambrook, 2012). Трансформація дріжджових клітин описана в роботі Sherman et al. (Sherman et al., 1986). Метод Beggs (Beggs, 1978) також є корисним. Щодо клітин хребетних, реагенти, придатні для трансфекції таких клітин, наприклад, фосфат кальцію і ДЕАЕ-декстран або ліпосомні препарати, доступні від компанії Stratagene Cloning Systems, або Life Technologies Inc., Гейтерсберг, Меріленд 20877, США. Електропорація також придатна для трансформації і (або) трансфекції клітин і відома в цій галузі як метод трансформації клітин дріжджів, клітин бактерій, клітин комах і клітин хребетних.

Успішно трансформовані клітини, тобто клітини, що містять ДНК-конструкцію за цим описом, можуть бути ідентифіковані добре відомими методами, такими як ПЛР. Альтернативно, присутність білка у супернатанті можна виявити за допомогою антитіл.

Зрозуміло, що певні клітини-хазяї за описом здатні синтезувати пептиди за описом, наприклад, клітини бактерій, дріжджів і комах. Проте в певних терапевтичних методах можуть використовуватися інші клітини-хазяї. Наприклад, антиген-презентуючі клітини, такі як дендритні клітини, можуть принагідно використовуватися, щоби експресувати пептиди за описом, які можуть бути навантажені на відповідні молекули МНС. Отже, цей опис також стосується клітини-хазяїна, що містить нуклеїнову кислоту або вектор експресії за цим описом.

У переважному втіленні клітина-хазяїн є антиген-презентуючою клітиною, зокрема дендритною клітиною або антиген-презентуючою клітиною. Управління з контролю за харчовими продуктами та лікарськими засобами (FDA) США 29 квітня 2010 року схвалило

застосування АПК, навантажених рекомбінантним злитим білком, що містить простатичну кислоту фосфатазу (PAP), для лікування метастатичного HRPC (гормон-рефрактерного раку передміхурової залози), що протікає безсимптомно або з мінімально вираженими симптомами (сіпулейцел-Т) (Rini et al., 2006; Small et al., 2006).

5 Згідно з ще одним аспектом опису пропонується спосіб отримання пептиду або його варіанта, причому спосіб включає культивування клітини-хазяїна і виділення пептиду з клітини-хазяїна або її культурального середовища.

В іншому втіленні білки ТКР, нуклеїнова кислота або вектор експресії за описом застосовуються у медицині. Наприклад, пептид або його варіант може бути приготований для
10 внутрішньовенного (в/в) введення, підшкірного (п/ш) введення, внутрішньошкірного (в/ш) введення, внутрішньочеревного (в/ч) введення, внутрішньом'язового (в/м) введення. Переважні способи введення пептиду – це п/ш, в/ш, в/ч, в/м і в/в. Переважними способами введення ДНК є в/ш, в/м, п/ш, в/ч і в/в. Можуть вводитись дози, наприклад, від 50 мкг до 1,5 мг, переважно від 125 мкг до 500 мкг пептиду або ДНК залежно від відповідного пептиду чи ДНК. Дози в цьому
15 діапазоні успішно використовувались в попередніх дослідженнях (Walter et al., 2012).

Полінуклеотид, що застосовується для активної вакцинації, може бути по суті чистим або включеним в належний вектор чи в систему доставки. Нуклеїнова кислота може бути представлена, наприклад, ДНК, кДНК, ПНК, РНК чи їхньою комбінацією. Методи конструювання і введення такої нуклеїнової кислоти добре відомі фахівцям в цій галузі. Їх огляд наведений,
20 наприклад, у роботі Teufel et al. (Teufel et al., 2005). Полінуклеотидні вакцини легко приготувати, але механізм дії цих векторів у виникненні імунної відповіді повністю не з'ясований. Прийнятні векторні системи і системи доставки включають вірусну ДНК і (або) РНК, такі як системи на базі аденовірусу, вірусу коров'ячої віспи, ретровірусу, вірусу герпесу, аденоасоційованого вірусу або гібридів, що містять елементи більш ніж одного вірусу. Невірусні системи доставки включають
25 катіонні ліпіди та катіонні полімери, добре відомі в галузі засобів доставки ДНК. Також може використовуватись фізична доставка, наприклад, за допомогою "генної гармати". Пептид або пептиди, що кодуються нуклеїновою кислотою, може (можуть) бути злитим білком, наприклад, з епітопом, що стимулює Т-клітини щодо відповідних протилежних CDR, як відзначається вище.

Лікарський засіб за описом може також включати один або більше ад'ювантів. Ад'юванти є речовинами, які у неспецифічний спосіб підвищують або підсилюють імунну відповідь
30 (наприклад, імунну відповідь на антиген, яку опосередковують CD8-позитивні Т-клітини і Т-хелпери (ТН), і, отже, можуть вважатися корисними для використання у лікарському засобі за описом. Відповідні ад'юванти включають, але не обмежуються ними, 1018 ISS, солі алюмінію, AMPLIVAX®, AS15, БЦЖ, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, флагелін чи ліганди TLR5, які походять з флагеліну, ліганд FLT3, ГМ-КСФ, IC30, IC31, іміквімод (ALDARA®), резиквімод, ImuFact IMP321, інтерлейкіни, такі як ІЛ-2, ІЛ-13, ІЛ-21, інтерферон-альфа чи -бета, або їхні
35 пегільовані похідні, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, імуностимулюючі комплекси ISCOM, JuvImmune®, LipoVac, MALP2, MF59, монофосфориловий ліпід А, монтанід IMS 1312, монтанід ISA 206, монтанід ISA 50V, монтанід ISA-51, емульсії "вода у маслі" та "масло у воді", OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, векторну систему PepTel®, мікрочастинки на основі полілактиду когліколіду [PLG] та декстрану, талактоферин, SRL172, віросоми та інші вірусоподібні частинки, YF-17D, VEGF trap, R848, бета-глюкан, Pam3Cys, стимулон QS21 Aquila, який виділяється з сапоніну, мікобактеріальні екстракти та синтетичні імітатори стінок бактеріальних клітин, а також інші патентовані ад'юванти, наприклад, Detox компанії Ribi, Quil чи
45 Superfos. Переважними є такі ад'юванти, як ад'ювант Фрейнда або ГМ-КСФ. Декілька імунологічних ад'ювантів (наприклад, MF59), специфічних до дендритних клітин, та способи їх приготування були описані раніше (Allison and Krummel, 1995). Також можуть застосовуватися цитокіни. Окремі цитокіни були прямо співвіднесені з впливом на міграцію дендритних клітин до лімфоїдних тканин (наприклад, TNF-), прискорюючи дозрівання дендритних клітин до ефективних антиген-презентуючих клітин для Т-лімфоцитів (наприклад, ГМ-КСФ, ІЛ-1 та ІЛ-4) (патент США № 5 849 589, конкретно включений в цей документ шляхом посилання в усій повноті) та діючі як імуноад'юванти (наприклад, ІЛ-12, ІЛ-15, ІЛ-23, ІЛ-7, ІФН-альфа, ІФН-бета) (Gabrilovich et al., 1996).
50

Також доповідалося про те, що імуностимулюючі CpG-олігонуклеотиди посилюють ефект ад'ювантів у складі вакцин. Якщо не вдаватися у подробиці теорії, CpG-олігонуклеотиди діють шляхом активації природної (не здобутої) імунної системи за допомогою Toll-подібних рецепторів (TLR), переважно TLR9. Активация TLR9, ініційована CpG, посилює антиген-специфічні гуморальні та клітинні реакції на широкий спектр антигенів, включаючи пептидні чи білкові антигени, живі або знищені віруси, вакцини на основі дендритних клітин, аутологічні
60 клітинні вакцини та полісахаридні кон'югати як в профілактичних, так і в терапевтичних

вакцинах. Важливішим є те, що посилюється визрівання та диференціація дендритних клітин, що в результаті збільшує активацію TH1-клітин та інтенсивну генерацію цитотоксичних Т-лімфоцитів (ЦТЛ) навіть за відсутності підтримки з боку CD4 Т-клітин. Активація TH1, індукована стимуляцією TLR9, зберігається навіть у присутності вакцинних ад'ювантів, таких як галун чи неповний ад'ювант Фрейнда (IFA), які зазвичай сприяють активації TH2. CpG-олігонуклеотиди демонструють навіть більшу ад'ювантну активність, коли переводяться в лікарську форму або вводяться разом з іншими ад'ювантами чи в таких формах, як мікрочастинки, наночастинки, ліпідні емульсії або подібні композиції, особливо необхідні для індукування сильної відповіді, коли антиген відносно слабкий. Вони також прискорюють імунну відповідь та дозволяють зменшити дози антигену приблизно на два порядки в порівнянні з відповідями антитіл на вакцину в повній дозі без CpG, як спостерігалось в деяких експериментах (Krieg, 2006). У патенті США 6 406 705 B1 описується комбіноване застосування CpG-олігонуклеотидів, ад'ювантів, що не містять нуклеїнові кислоти, та антигену для індукування антиген-специфічної імунної відповіді. CpG TLR9-антагоністом є dSLIM (імуномодулятор із структурою типу дволанцюжкове стебло-петля) компанії Mologen (Берлін, Німеччина), котрий є переважним компонентом фармацевтичної композиції за цим описом. Також можуть використовуватись інші TLR-зв'язувальні молекули, наприклад, TLR 7, TLR 8 і (або) TLR 9, що зв'язуються з РНК.

Інші приклади прийнятих ад'ювантів включають, без обмежень, хімічно модифіковані CpG (наприклад, CpR, Idera), аналоги дЛРНК, такі як полі(I:C) та їхні похідні (наприклад, AmpliGen®, Hiltonol®, полі-(ICLC), полі(IC-R), полі(I:C12U), бактеріальні ДНК або РНК, відмінні від CpG, а також невеликі імунологічно активні молекули та антитіла, такі як циклофосфамід, сунітиніб, бевацизумаб, целебрекс, NCX-4016, сілденафіл, тадалафіл, варденафіл, сорафеніб, темозоломід, темзиролімум, XL-999, CP-547632, пазопаніб, VEGF Trap, ZD2171, AZD2171, анти-CTLA4, інші антитіла, націлені на ключові структури імунної системи (наприклад, анти-CD40-, анти-TGFβ-ета-, анти-TNFα-альфа-рецептори) та SC58175, які можуть діяти терапевтично і (або) як ад'юванти. Кількості та концентрації ад'ювантів та добавок, прийнятих в контексті цього опису, можуть бути легко визначені досвідченим фахівцем без зайвого експериментування.

Переважними ад'ювантами є анти-CD40-антитіла, іміквімод, резиквімод, ГМ-КСФ, циклофосфамід, сунітиніб, бевацизумаб, інтерферон-альфа, CpG олігонуклеотиди та їх похідні, полі-(I:C) та її похідні, РНК, сілденафіл і композиції з твердих мікрочастинок з PLG або віросоми.

В переважному втіленні фармацевтичної композиції за описом ад'ювант вибирається з групи, що складається з колонієстимулюючих факторів, таких як Фактор стимулювання утворення колоній гранулоцитів-макрофагів (ГМ-КСФ, сарграмостим), циклофосфамід, іміквімод, резиквімод та інтерферон-альфа.

В переважному втіленні фармацевтичної композиції за винаходом ад'ювант вибирається з групи, що складається з колонієстимулюючих факторів, таких як Фактор стимулювання утворення колоній гранулоцитів-макрофагів (ГМ-КСФ, сарграмостим), циклофосфамід, іміквімод і резиквімод. У переважному втіленні фармацевтичної композиції за винаходом ад'ювантом є циклофосфамід, іміквімод чи резиквімод. Навіть більш переважними ад'ювантами є монтанід IMS 1312, монтанід ISA 206, монтанід ISA 50V, монтанід ISA-51, полі-ICLC (Hiltonol®) і моноклональні анти-CD40-антитіла або їх комбінація.

Ця композиція може застосовуватися для парентерального введення, наприклад, підшкірного, внутрішньошкірного, внутрішньом'язового або для перорального застосування. Для цього пептиди і необов'язково інші молекули розчиняють або суспендують у фармацевтично прийнятному, переважно водному носіїві. Крім того, композиція може містити допоміжні речовини, такі як буфери, зв'язувальні речовини, баластні речовини, розріджувачі, ароматизатори, антифрикційні речовини тощо. Пептиди можна також ввести разом із імуностимуляторами, такими як цитокіни. Великий перелік допоміжних речовин, які можна використовувати у такій композиції, можна знайти, наприклад, у посібнику A. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients (Kibbe, 2000). Ця композиція може застосовуватися для попередження, профілактики і (або) лікування аденоматозних або ракових захворювань. Приклади фармацевтичних композицій наведені, наприклад, у EP2113253.

Важливо розуміти, що імунна відповідь, ініційована вакциною за описом, спрямована проти ракових клітин на різних стадіях клітинного циклу і на різних стадіях розвитку пухлини. Більш того, атака здійснюється на різні асоційовані з раковими пухлинами сигнальні шляхи. Це є перевагою над вакцинами, які направлені тільки на одну чи малу кількість мішеней, що може привести до легкої адаптації пухлини до атаки (уникання пухлиною). Більш того, не усі індивідуальні пухлини експресують одну й ту саму картину антигенів. Таким чином, комбінація декількох пухлино-асоційованих пептидів гарантує, що кожна окрема пухлина несе принаймні деякі з мішеней. Композиція була створена виходячи з того, що, як очікується, кожна пухлина

експресує декілька антигенів і охоплює декілька незалежних сигнальних шляхів, необхідних для росту і розвитку пухлини. Таким чином, вакцину може легко використовувати у "готовому для застосування" вигляді для більшої популяції пацієнтів. Це означає, що попередній відбір пацієнтів, що потребують лікування цією вакциною, можна обмежити типуванням за HLA, не потребує будь-якого додаткового дослідження біомаркерів експресії антигенів, але все ж забезпечується одночасна атака декількох мішеней у вигляді індукованої імунної відповіді, що є важливим для ефективності (Banchereau et al., 2001; Walter et al., 2012).

Термін "каркас" в контексті цього винаходу означає молекулу, яка специфічно зв'язується з (наприклад, антигенною) детермінантою. В одному з втілень каркас здатний направляти об'єкт, до якого він приєднаний (наприклад, (другий) антиген-зв'язувальний елемент) до сайту-мішені, наприклад, до клітини конкретного виду пухлини або до стромы пухлини, що несе антигенну детермінанту (наприклад, комплекс пептид-МНС відповідно до цієї патентної заявки). В іншому втіленні каркас здатний активувати сигнальний шлях через його антиген-мішень, наприклад, антиген комплексу Т-клітинного рецептора. Каркаси включають, але не обмежуються ними, антитіла і їх фрагменти, антиген-зв'язувальні домени антитіл, що містять варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла і варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла, зв'язувальні білки, що містять принаймні один модуль анкіринового повтору і однодоменні антиген-зв'язувальні (SDAB) молекули, аптамери, (розчинні) ТКР і (модифіковані) клітини, такі як алогенні або аутологічні Т-клітини. Щоб оцінити, чи буде молекула каркасом, що зв'язується з мішенню, можна провести аналіз зв'язування.

"Специфічне" зв'язування означає, що каркас зв'язує досліджуваний комплекс пептид-МНС краще ніж інші природно існуючі комплекси пептид-МНС до такої міри, що каркас, споряджений активною молекулою, яка здатна знищувати клітину, що несе конкретну мішень, не здатний знищувати іншу клітину без конкретної мішені, але таку, що презентує інший(-і) комплекс(-и) пептид-МНС. Зв'язування з іншими комплексами пептид-МНС не має значення, якщо пептид, що бере участь у перехресній реакції комплексу пептид-МНС, не зустрічається в природі, тобто не отриманий із пептидому HLA. Тести для оцінки знищення клітин-мішеней добре відомі фахівцям в цій галузі. Їх потрібно виконувати з використанням клітин-мішеней (первинних клітинних культур або клітинних ліній) із незміненою презентацією пептидів молекулами МНС, або клітин, навантажених пептидами, у такий спосіб, щоб були досягнуті природні рівні комплексів пептид-МНС.

Кожний каркас може містити мітку, яка забезпечує можливість виявлення зв'язаного каркаса шляхом визначення присутності або відсутності сигналу, який генерує мітка. Наприклад, каркас може бути міченим флуоресцентним барвником або іншою застосовною маркерною молекулою клітини. Такі маркерні молекули добре відомі в цій галузі. Наприклад, флуоресцентне мічення, наприклад, флуоресцентним барвником, може забезпечити візуалізацію зв'язаного аптамеру за допомогою флуоресценції або лазерної сканувальної мікроскопії або проточної цитометрії.

Кожний каркас може бути кон'югованим із другою активною молекулою, такою як, наприклад, ІЛ-21, антитіло проти CD3 і антитіло проти CD28.

Додаткову інформацію про поліпептидні каркаси див., наприклад, у розділі "Передумова створення винаходу" у заявці WO 2014/071978A1 і у посиланнях, наведених в ній.

Цей опис також стосується аптамерів. Аптамери (див., наприклад, WO 2014/191359 і посилання, наведені в цій роботі) є молекулами коротких одноланцюгових нуклеїнових кислот, які можуть складатися у певні тривимірні структури і розпізнавати специфічні структури-мішені. Вони, очевидно, є прийнятними альтернативами для розробки таргетної терапії. Було показано, що аптамери селективно зв'язуються з багатьма складними мішенями з високою афінністю і специфічністю.

Аптамери, що розпізнають розташовані на поверхні молекули, були ідентифіковані у минулому десятиріччі і забезпечують засоби для розробки діагностичних і терапевтичних підходів. Оскільки було показано, що аптамери майже не проявляють жодної токсичності і імуногенності, вони є перспективними кандидатами у речовини для біомедичних застосувань. Справді, аптамери, наприклад, такі, що розпізнають простат-специфічні мембранні антигени, були успішно застосовані для таргетної терапії, і було показано, що вони виявляють ці функції в трансплантатних моделях *in vivo*. Більш того, були ідентифіковані аптамери, які розпізнають конкретні лінії пухлинних клітин.

Можуть бути вибрані аптамери ДНК, що проявляють розпізнавальні властивості широкого спектру по відношенню до різних ракових клітин, особливо до таких, що отримані з солідних пухлин, у той час як непухлинногенні і первинні здорові клітини ними не розпізнаються. Якщо ідентифіковані аптамери розпізнають не тільки підтип конкретної пухлини, але скоріше

взаємодіють з рядом пухлин, це надає аптамерам властивість бути застосовними в якості так званих діагностичних і терапевтичних засобів широкого спектру.

Далі, дослідження зв'язувальних властивостей по відношенню до клітин методом проточної цитометрії показало, що аптамери виявляють дуже добру позірну афінність, яка знаходиться у наномолярному діапазоні.

Аптамери можуть використовуватися для діагностичних і терапевтичних цілей. В одному аспекті принаймні один або декілька аптамерів поглинаються пухлинними клітинами і таким чином можуть використовуватися як молекулярні носії для цілеспрямованої доставки протиракових препаратів, таких як міРНК, у пухлинні клітини.

Можуть бути вибрані аптамери проти складних мішеней, таких як клітини і тканини і комплекси пептидів за цим описом із молекулою МНС з використанням методики SELEX (Систематична еволюція лігандів шляхом експоненційного збагачення).

Пептиди за цим описом можуть використовуватися для продукції і розробки антитіл, специфічних до комплексів МНС/пептид. Вони можуть застосовуватися для лікування, націлюючи токсини або радіоактивні речовини на хворі тканини. Іншим використанням цих антитіл може бути націлювання радіонуклідів на хворі тканини з метою формування зображень, таких як позитронна емісійна томографія (ПЕТ). Таке використання може виявляти невеликі метастази або визначати розмір і точну локалізацію хворих тканин.

Таким чином, в ще одному аспекті цей опис стосується способу отримання рекомбінантного антитіла, яке специфічно зв'язується з головним комплексом гістосумісності (МНС) людини I або II класу, який входить до складу комплексу з антигенами, обмеженими за HLA, причому спосіб включає: імунізацію ссавців нелюдського походження, отриманих методами генної інженерії, які містять клітини, що експресують згаданий головний комплекс гістосумісності (МНС) людини I або II класу із розчинною формою молекули МНС I або II класу, яка входить до складу комплексу зі згаданими антигенами, обмеженими за HLA; виділення молекул іРНК із клітин згаданих ссавців нелюдського походження, що продукують антитіла; отримання бібліотеки фагового дисплея, що містить фаги, які експонують молекули білка, який кодується згаданими молекулами іРНК; і виділення принаймні одного фага із згаданої бібліотеки фагового дисплея, причому згаданий принаймні один фаг експонує згадане антитіло, що специфічно зв'язується із згаданим головним комплексом гістосумісності (МНС) людини I або II класу, який входить до складу комплексу із згаданим антигеном, обмеженим за HLA.

У ще одному аспекті цей опис стосується антитіла, яке специфічно зв'язується з головним комплексом гістосумісності (МНС) людини I або II класу, який входить до складу комплексу з антигенами, рестрикованими за HLA, в якому антитіло переважно є поліклональним антитілом, моноклональним антитілом, біспецифічним антитілом і (або) химерним антитілом.

Відповідні способи отримання таких антитіл і одноланцюгових головних комплексів гістосумісності (МНС) I класу, а також інших інструментів отримання цих антитіл розкриті в заявках WO 03/068201, WO 2004/084798, WO 01/72768, WO 03/070752 і статтях (Cohen et al., 2003a; Cohen et al., 2003b; Denkberg et al., 2003), які для цілей цього опису всі у прямій формі включені в цей документ шляхом посилання в усій повноті.

Переважно, антитіло зв'язується з спорідненістю на рівні нижче 20 наномолів, переважно нижче 10 наномолів, у комплекс, який також вважається "специфічним" у контексті цього опису.

Цей опис стосується білка ТКР або його варіанта чи функціонального фрагмента, який специфічно зв'язується з MAG-003.

Цей опис також стосується білка ТКР за цим описом, де згаданий білок ТКР є (хімічно) модифікованим і (або) включає непептидні зв'язки.

Цей опис також стосується нуклеїнової кислоти, що кодує білки ТКР за цим описом за умови, що білок ТКР не є повністю (цілковито) людським білком.

Цей опис також стосується нуклеїнової кислоти за цим описом, яка являє собою ДНК, кДНК, ПНК, РНК чи їх комбінацію.

Цей опис також стосується вектора експресії, що здатний експресувати нуклеїнову кислоту за цим описом.

Цей опис також стосується білка ТКР за цим описом, нуклеїнової кислоти за цим описом або вектора експресії за цим описом для застосування в медицині, зокрема в лікуванні недрібноклітинного раку легенів.

Цей опис також стосується клітини-хазяїна, що містить нуклеїнову кислоту за цим описом або вектор експресії за цим описом.

Цей опис також стосується клітини-хазяїна за цим описом, яка є Т-клітиною, і переважно CD8-позитивною Т-клітиною або CD4-позитивною Т-клітиною.

Цей опис також стосується способу отримання білка ТКР відповідно до цього опису, причому згаданий спосіб включає інкубування МКПК, отриманих у HLA-A*02-негативних здорових донорів, із A2/MAG-003 мономерами, інкубування МКПК з тетрамер-фікоеритрином (ФЕ) і виділення високоавідних Т-клітин методом флуоресцентного сортування клітин на аналізаторі FACS Calibur.

Цей опис також стосується способу отримання білка ТКР відповідно до цього опису, причому згаданий спосіб включає інкубування МКПК, отриманих у HLA-A*02-негативних здорових донорів, із A2/p286-1Y2L мономерами, інкубування МКПК з тетрамер-фікоеритрином (ФЕ) і виділення високоавідних Т-клітин методом флуоресцентного сортування клітин на аналізаторі FACS Calibur.

Цей опис також стосується способу отримання білка ТКР відповідно до цього опису, причому згаданий спосіб включає інкубування МКПК, отриманих у HLA-A*02-негативних здорових донорів, із A2/p286-1Y2L9L мономерами, інкубування МКПК з тетрамер-фікоеритрином (ФЕ) і виділення високоавідних Т-клітин методом флуоресцентного сортування клітин на аналізаторі FACS Calibur.

Цей опис також стосується способу отримання білка ТКР відповідно до цього опису, де згаданий спосіб включає отримання трансгенної миші з цілими локусами генів людини ТКР $\alpha\beta$ (1,1 і 0,7 млн. п. н.), Т-клітини якої експресують широкий спектр ТКР людини, які компенсують дефіцит ТКР у миші, імунізацію миші MAG-003, інкубування МКПК, отриманих від трансгенних мишей, з тетрамер-фікоеритрином (ФЕ) і виділення високоавідних Т-клітин методом флуоресцентного сортування клітин на аналізаторі FACS Calibur.

Цей опис також стосується способу отримання білка ТКР відповідно до цього опису, де згаданий спосіб включає отримання трансгенної миші з цілими локусами генів людини ТКР $\alpha\beta$ (1,1 і 0,7 млн. п. н.), Т-клітини якої експресують широкий спектр ТКР людини, які компенсують дефіцит ТКР у миші, імунізацію миші p286-1Y2L, інкубування МКПК, отриманих від трансгенних мишей, з тетрамер-фікоеритрином (ФЕ) і виділення високоавідних Т-клітин методом флуоресцентного сортування клітин на аналізаторі FACS Calibur.

Цей опис також стосується способу отримання білка ТКР відповідно до цього опису, де згаданий спосіб включає отримання трансгенної миші з цілими локусами генів людини ТКР $\alpha\beta$ (1,1 і 0,7 млн. п. н.), Т-клітини якої експресують широкий спектр ТКР людини, які компенсують дефіцит ТКР у миші, імунізацію миші p286-1Y2L9L, інкубування МКПК, отриманих від трансгенних мишей, з тетрамер-фікоеритрином (ФЕ) і виділення високоавідних Т-клітин методом флуоресцентного сортування клітин на аналізаторі FACS Calibur.

Цей опис також стосується способу знищення клітин-мішеней в організмі пацієнта, клітини-мішені якого аберантно експресують MAG-003, причому спосіб включає введення в організм пацієнта ефективної кількості Т-клітин за цим описом.

Цей опис також стосується застосування будь-якого білка ТКР, що описаний тут, нуклеїнової кислоти за цим описом, вектора експресії за цим описом, клітини за цим описом, або активованого цитотоксичного Т-лімфоцита за цим описом, як лікарського засобу або в процесі виробництва лікарського засобу. Цей опис також стосується застосування за цим описом, де лікарський засіб виявляє протиракову активність.

Цей опис також стосується застосування за цим описом, де згадані ракові клітини є клітинами недрібноклітинного раку легенів або клітинами інших солідних або гематологічних пухлин, таких як недрібноклітинний рак легенів, дрібноклітинний рак легенів, нирковоклітинний рак, рак головного мозку, рак шлунка, колоректальний рак, гепатоцелюлярний рак, рак підшлункової залози, рак передміхурової залози, лейкоз, рак молочної залози, карцинома з клітин Меркеля, меланома, рак яєчника, рак сечового міхура, рак матки, рак жовчного міхура і рак жовчних протоків і рак стравоходу.

Цей опис також стосується конкретних маркерних білків і біомаркерів на основі пептидів за цим описом, які у цьому документі іменуватимуться як "мішені", які можуть використовуватися в діагностиці і (або) визначенні прогнозу перебігу недрібноклітинного раку легенів. Цей опис також стосується застосування цих нових мішеней для лікування раку.

Термін "антитіло" або "антитіла" використовується в тут у широкому сенсі і включає як поліклональні, так і моноклональні антитіла. На додаток до інтактних або "повнорозмірних" молекул імуноглобуліну, до терміну "антитіла" також входять фрагменти (наприклад, фрагменти CDR, Fv, Fab і Fc) або полімери цих молекул імуноглобуліну і гуманізовані версії молекул імуноглобуліну, за умови, що вони виявляють будь-які з бажаних властивостей (наприклад, специфічне зв'язування (полі)пептидного маркера недрібноклітинного раку легенів, доставку токсину до клітини недрібноклітинного раку легенів, що експресує ген-маркер раку на

підвищеному рівні, і (або) інгібування активності поліпептидного маркера недрібноклітинного раку легенів) відповідно до цього опису.

За найменшої можливості антитіла за описом слід закуповувати у комерційних підприємств. Антитіла за описом можуть також бути отримані з використанням добре відомих методів. Кваліфікований фахівець зрозуміє, що для отримання антитіл за описом можуть бути використані як повнорозмірні поліпептидні маркери недрібноклітинного раку легенів, так і їх фрагменти. Поліпептид, який буде використовуватися для отримання антитіл за описом, може бути повністю чи частково очищеним компонентом природного джерела або може бути отриманий за допомогою технології рекомбінантних ДНК.

Фахівцю в цій галузі відомо, що отримання двох або більше різних комплексів моноклональних або поліклональних антитіл максимально збільшує ймовірність отримання антитіла, що буде мати специфічність та афінність, необхідні для використання за призначенням (наприклад, для ELISA, імуногістохімічних методів, візуалізації *in vivo*, лікування імунотоксинами). Антитіла досліджують на бажану активність добре відомими методами, відповідно до цілей, у яких мають використовуватися антитіла (наприклад, ELISA, імуногістохімічні методи, імунотерапія тощо; додаткові відомості щодо отримання і перевірки антитіл див., наприклад, Greenfield, 2014 (Greenfield, 2014)). Наприклад, антитіла можуть бути досліджені методами ELISA, Вестерн-блотингу, імуногістохімічним забарвленням фіксованих формаліном зрізів ракової тканини або заморожених зрізів тканини. Після попередніх досліджень *in vitro* антитіла, які мають використовуватися для терапевтичних цілей або для діагностики *in vivo*, досліджують з використанням відомих методів клінічного дослідження.

Термін "моноклональне антитіло" в тому виді, в якому він використовується тут, означає антитіло, отримане із по суті гомогенної популяції антитіл, тобто індивідуальні антитіла, що складають популяцію, є ідентичними, за винятком можливих мутантних форм, що спостерігаються в природі, які можуть бути присутніми в незначній кількості. Моноклональні антитіла за цим патентом конкретно включають "химерні" антитіла, у яких частина важкого і (або) легкого ланцюга ідентична або гомологічна відповідним послідовностям в антитілах, отриманих із окремого виду, або які належать до окремого класу чи підкласу антитіл, в той час як решта ланцюга (ланцюгів) ідентична або гомологічна відповідним послідовностям в антитілах, отриманих із іншого виду або які належать до іншого класу чи підкласу антитіл, а також фрагментів таких антитіл, за умови, що вони виявляють бажану антагоністичну активність (Пат. США 4 816 567, включений в цей документ шляхом посилання в усій повноті).

Моноклональні антитіла за описом можуть бути отримані гібридомними технологіями. У гібридомних технологіях мишу або іншу прийнятну тварину-хазяїна, як правило, імунізують імунізуючим агентом для створення лімфоцитів, які продукують або здатні продукувати антитіла, які специфічно зв'язуються з імунізуючим агентом. Альтернативно, лімфоцити можуть бути імунізовані *in vitro*.

Моноклональні антитіла можуть також бути створені технологіями рекомбінантних ДНК, такими як описані в патенті США 4 816 567. ДНК, що кодує моноклональні антитіла за описом, можна легко виділити і секвенувати з використанням традиційних методик (наприклад, використовуючи олігонуклеотидні зонди, здатні специфічно зв'язуватися з генами, що кодують важкі та легкі ланцюги антитіл миші).

Методи *in vitro* також придатні для створення одновалентних антитіл. Розщеплення антитіл з метою отримання їх фрагментів, зокрема, Fab-фрагментів, можна провести з використанням стандартних методик, відомих у галузі. Наприклад, розщеплення можна виконати за допомогою папаїну. Приклади розщеплення папаїном описані у заявці WO 94/29348 і в патенті США 4 342 566. При розщепленні антитіл папаїном, як правило, утворюються два ідентичних антиген-зв'язувальних фрагменти, які зветься Fab-фрагментами, кожний з одним антиген-зв'язувальним сайтом, і залишковим Fc фрагментом. Обробка пепсином дає фрагмент F(ab')₂ і фрагмент pFc'.

Фрагменти антитіл, чи то з'єднані з іншими послідовностями, чи ні, можуть також включати вставки, делеції, заміни або інші вибрані модифікації окремих частин або амінокислотних залишків за умови, що активність фрагмента не є значно зміненою або пошкодженою у порівнянні з немодифікованим антитілом або фрагментом антитіла. Ці модифікації можуть надати деякі додаткові властивості, такі як видалити/додати амінокислоти, що здатні до дисульфідного зв'язування, підвищити біологічну довговічність, змінити секреторні властивості тощо. У будь-якому випадку, фрагмент антитіла має виявляти біологічну активність, таку як зв'язувальна активність, регулювання зв'язування у зв'язувальному домені тощо. Функціональні або активні центри антитіла можуть бути ідентифіковані шляхом мутагенезу конкретної ділянки білка, який супроводжується експресією і перевіркою експресованого поліпептиду. Такі методи є

цілком очевидними для фахівця у цій галузі і можуть включати сайт-специфічний мутагенез нуклеїнової кислоти, що кодує фрагмент антитіла.

Антитіла за описом можуть додатково включати гуманізовані антитіла або людські антитіла. Гуманізованими формами антитіл нелюдського походження (наприклад, мишачі) є химерні імунoglobуліни, ланцюги імунoglobулінів або їх фрагменти (такі як Fv, Fab, Fab' та інші антиген-зв'язувальні послідовності антитіл), які містять мінімальну послідовність, отриману з імунoglobуліну нелюдського походження. Гуманізовані антитіла включають імунoglobуліни людини (антитіло-реципієнт), в яких залишки від комплементарної детермінантної групи (CDR) реципієнта заміщені залишками від CDR нелюдського походження (антитіло-донор), такого як від миші, щура або кроля, що має бажану специфічність, афінність і зв'язувальну здатність. У деяких випадках Fv каркасні (FR) залишки імунoglobуліну людини є заміщеними відповідними залишками нелюдського походження. Гуманізовані антитіла можуть включати залишки, які не були виявлені ні в антитілі-реципієнті, ні в імпортованих CDR або послідовностях каркаса. Як правило, гуманізоване антитіло буде містити по суті всі з принаймні одного, а зазвичай двох варіабельних доменів, в яких всі або по суті всі із ділянок CDR відповідають ділянкам імунoglobуліну нелюдського походження і всі або по суті всі із ділянок FR є ділянками консенсусної послідовності імунoglobуліну людини. Оптимально, якщо гуманізоване антитіло містить також принаймні частину константної ділянки імунoglobуліну (Fc), зазвичай ділянку імунoglobуліну людини.

Методи гуманізації нелюдських антитіл добре відомі фахівцю у цій галузі. Загалом, гуманізоване антитіло має один або більше амінокислотних залишків, введених в нього з джерела нелюдського походження. Ці амінокислотні залишки нелюдського походження часто називають "імпортними" залишками, які зазвичай беруть із "імпортного" варіабельного домену. Гуманізацію можна по суті провести шляхом заміщення CDR або послідовностей CDR гризунів відповідними послідовностями людського антитіла. Відповідно, такі "гуманізовані" антитіла є химерними антитілами (патент США 4 816 567), в яких суттєво менша частина ніж інтактний варіабельний домен людини була заміщена відповідною послідовністю біологічних видів, відмінних від людини. На практиці гуманізовані антитіла є зазвичай людськими антитілами, в яких деякі залишки CDR і, можливо, залишки FR є заміщеними залишками з аналогічних сайтів антитіл гризунів.

Можуть використовуватися трансгенні тварини (наприклад, миші), які після імунізації набувають здатність продукувати повний спектр людських антитіл в умовах відсутності продукування ендogenous імунoglobуліну. Наприклад, було описано, що гомозиготна делеція гена, що кодує ділянку з'єднання важких ланцюгів антитіла, у химерних клітин і лінії клітин зародків мутантних мишей приводить до повного інгібування продукування ендogenous антитіл. Перенесення генної матриці імунoglobуліну клітин зародків людини у лінію клітин зародків мутантних мишей приводить до продукування людських антитіл після антигенної стимуляції. Людські антитіла можуть також бути виділені методом фагового дисплея з комбінаторної бібліотеки.

Антитіла за описом переважно вводять суб'єкту у фармацевтично прийнятному носіїві. Як правило, для надання фармацевтичній композиції ізотонічності використовують відповідну кількість фармацевтично прийнятної солі. Приклади фармацевтично прийнятного носія включають фізіологічний розчин, розчин Рінгера і розчин глюкози. рН розчину переважно має становити приблизно від 5 до 8, і більш переважно приблизно від 7 до 7,5. Додатково пропонуються носії, що включають препарати з тривалим вивільненням, такі як напівпроникні матриці твердих гідрофобних полімерів, які містять антитіла, причому ці матриці мають вигляд сформованих предметів, наприклад, плівок, ліпосом або мікрочастинок. Фахівцю в цій галузі зрозуміло, що певні носії можуть бути більш переважними, залежно від, наприклад, способу введення і концентрації антитіла, що вводиться.

Антитіла можна вводити суб'єкту, пацієнту або в клітину шляхом ін'єкції (наприклад, внутрішньовенної, внутрішньочеревної, підшкірної, внутрішньом'язової) або іншими методами, такими як інфузія, яка гарантує їх доставку у кровотік у ефективній формі. Антитіла можуть також бути введені внутрішньопухлинним або перитуморальним шляхом з метою отримати місцевий, а також системний терапевтичний ефект. Кращими є місцеве або внутрішньовенне введення.

Ефективні дози і режими дозування для введення антитіл можна визначити емпіричним шляхом, такі визначення знайомі фахівцю в цій галузі. Фахівцю в цій галузі зрозуміло, що дози антитіл, які необхідно вводити, залежать, наприклад, від суб'єкта, який отримує антитіла, шляху введення, конкретного типу використовуваних антитіл та інших лікарських препаратів, які вводяться. Типова добова доза при монотерапії антитілами може становити від приблизно 1

мкг/кг до 100 мг/кг маси тіла або більше на добу, залежно від вищезгаданих факторів. Після введення антитіл, переважно з метою лікування недрібноклітинного раку легенів, ефективність терапевтичної дії антитіл можна оцінити різними способами, відомими фахівцю в цій галузі. Наприклад, розмір, кількість і (або) розповсюдження раку в організмі суб'єкта, що отримує

лікування, можна контролювати за допомогою стандартних методик візуалізації пухлин. Введене з терапевтичними цілями антитіло, яке затримує ріст пухлини, приводить до скорочення пухлини і (або) запобігає розвитку нових пухлин у порівнянні з перебігом захворювання, який би спостерігався за відсутності введення антитіла, є ефективним антитілом для лікування гліобластоми.

У ще одному аспекті цей опис стосується способу отримання розчинного Т-клітинного рецептора (pTKR), що розпізнає конкретний комплекс пептиду і МНС. Такі розчинні Т-клітинні рецептори можуть бути отримані зі специфічних клонів Т-клітин, і їх спорідненість можна підвищити мутагенезом, націленим на ділянки, що визначає комплементарність. З метою вибору Т-клітинних рецепторів може використовуватися метод фагового дисплея (заявка США 20100113300, (Liddy et al., 2012)). З метою стабілізації Т-клітинних рецепторів у процесі фагового дисплея і у разі практичного застосування як лікарського препарату альфа- і бета-ланцюги можуть буди зв'язані, наприклад ненативними дисульфідними зв'язками, іншими ковалентними зв'язками (одноланцюговий Т-клітинний рецептор) або доменами димеризації (Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999). Т-клітинний рецептор може бути зв'язаний з токсинами, лікарськими препаратами, цитокінами (див., наприклад, заявку США 2013/0115191), доменами, що залучають ефекторні клітини, такі як домени антитіл проти CD3 тощо, щоб виконувати конкретні функції на клітинах-мішенях. В іншому аспекті він експресується у Т-клітинах, що використовуються для адоптивного переносу. Див., наприклад, заявки WO 2004/033685A1, WO 2004/074322A1, і WO 2013/057586A1, вміст яких включений в цей документ шляхом посилання в усій повноті.

Крім того, пептиди і (або) ТКР, або антитіла, або інші зв'язувальні молекули за цим описом можуть використовуватися для підтвердження діагнозу "рак", поставленому патоморфологом на основі дослідження біоптату.

Ці антитіла або ТКР можуть використовуватися також для діагностики *in vivo*. Зазвичай антитіла мітять радіонуклідами (такими як ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^3H , ^{32}P або ^{35}S), щоб пухлину можна було локалізувати, використовуючи імуносцинтиграфію. В одному з втілень антитіла або їх фрагменти зв'язуються з зовнішньоклітинними доменами двох або більше таких мішеней білка, вибраного з групи, що складається з вищезгаданих білків, із константою зв'язування (K_d) меншою ніж 1×10 мкМ.

Антитіла для діагностичного застосування можна мітити зондами, що підходять для виявлення різними методами візуалізації. Методи виявлення зондів включають, але не обмежуються ними, флуоресценцію, світлову, конфокальну і електронну мікроскопію, магнітно-резонансну візуалізацію і спектроскопію, флуороскопію, комп'ютерну томографію та позитронну емісійну томографію. Відповідні зонди включають, але не обмежуються ними, флуоресцеїн, родамін, еозин та інші флуорофори, радіоізотопи, золото, гадоліній та інші лантаноїди, парамагнітне залізо, фтор-18 та інші радіонукліди, що випромінюють позитрони. Крім цього, зонди можуть бути бі- або багатофункціональними і виявлятися більш ніж одним із зазначених методів. Ці антитіла можуть бути безпосередньо або опосередковано мічені вищезгаданими зондами. Прикріплення зондів до антитіл включає ковалентне зв'язування зонда, включення зонда в антитіло і ковалентне прикріплення хелатуючої сполуки для зв'язування зонда, серед інших методів, добре відомих фахівцю у цій галузі. У разі імуногістохімічних методів зразок хворої тканини може бути свіжим чи замороженим або може бути залитим у парафін і фіксованим за допомогою консерванту, такого як формалін. Фіксовані або залиті зразки зрізів тканин приводять у контакт із міченим первинним антитілом і вторинним антитілом, де антитіло використовується для виявлення експресії цих білків *in situ*.

Цей винахід буде проілюстрований наведеними нижче прикладами, які, тим не менш, не обмежуються наведеними тут. Для цілей цього винаходу всі цитовані джерела включені в цей документ шляхом посилання в усій повноті.

На Фігурі 1 наведена експресія екзону MAG-003 в MAGEA4 (пухлинні у порівнянні із здоровими тканинами, дані RNASeq). Експресія екзону MAG-003 в MAGEA4 на здорових тканинах порівнювалася з його експресією на різних солідних пухлинах (червоні стовпчики). Підтипи здорових тканин розподілені по групах як тканини високого (темно-зелені стовпчики), середнього (світло-зелені стовпчики) і низького (сірі стовпчики) ризику. Кожний стовпчик означає окремий зразок. Високий рівень експресії на нормальних тканинах був виявлений лише

у плаценті і яєчку (низький ризик). (RPKM – кількість зчитувань на кілобазу, у перерахунку на мільйон картованих зчитувань)

На Фігурі 2 наведена експресія екзону MAG-003 на MAGEA8 (пухлинному у порівнянні із здорової тканини, дані RNASeq). Експресія екзону MAGEA8 на здорових тканинах порівнювалася з його експресією на різних солідних пухлинах (червоні стовпчики). Підтипи здорових тканин розподілені по групах як тканини високого (темно-зелені стовпчики), середнього (світло-зелені стовпчики) і низького (сірі стовпчики) ризику. Кожний стовпчик означає окремий зразок. Високий рівень експресії на нормальних тканинах був виявлений лише у плаценті (низький ризик). (RPKM – кількість зчитувань на кілобазу, у перерахунку на мільйон картованих зчитувань)

На Фігурах 3–5 показане вивільнення ІФН-гамма з CD8+Т-клітин, у які методом електропорації введена РНК альфа- і бета-панчюгів MAG-003-специфічних ТКР після сумісної інкубації з клітинами-мішенями, навантаженими пептидом MAG-003 (SEQ ID NO:1) або різними варіантами MAG-003, у яких проведена заміна аланіну у позиціях 1–9 послідовності SEQ ID NO:1, як це розкрито тут.

На Фігурі 6 показана експресія MAGEA4 для прикладу 7. іРНК MAGEA4 піддається виявленню у представлених ракових зразках. Рівні експресії охоплюють діапазон від значної експресії у зразках раку голови та шиї і недрібноклітинного раку легенів (HNSCC062T1, HNSCC064T1 і NSCLC004T1) до досить низької експресії у зразках недрібноклітинного раку легенів і раку яєчника (NSCLC006T1 і OC036T1).

Приклади

Алореактивну відповідь можна використати для уникання ауто толерантності і отримання Т-клітин з вищою авідністю у порівнянні з Т-клітинами аутологічного походження, тобто від аутологічних пацієнтів. Приклади таких умов включають отримання *in vitro* ало-HLA-реактивних пептид-специфічних Т-клітин (Sadovnikova et al. 1998; Savage et al. 2004; Wilde et al. 2012) та імунізацію мишей, трансгенних для МНС або ТКР людини (Stanislawski et al. 2001; Li et al. 2010).

Приклад 1

Отримання *in vitro* ало-HLA реактивних, пептид-специфічних Т-клітин (Savage et al. 2004)

Використовувалися МКПК від HLA-A*02-негативних здорових донорів після отримання від них інформованої згоди. Мономери біотинільованих рекомбінантних молекул HLA-A2 I класу та A2-флуоресцентні тетрамери, що містять MAG-003, були отримані у MBLI (Вобурн, Массачусетс, США). МКПК інкубували з антитілами проти CD20SA, розведеними забуференим фосфатами фізіологічним розчином (PBS) протягом 1 години за кімнатної температури, промивали і інкубували з біотинільованими мономерами A2/MAG-003 протягом 30 хвилин за кімнатної температури, промивали і висівали в концентрації 3×10^6 клітин/лунку на 24-лункові планшети з середовищем RPMI, у яке додана АВ-сироватка людини. Інтерлейкін 7 (ІЛ-7, R&D Systems, Міннеаполіс, Міннесота, США) додавали у день 1 у концентрації 10 нг/мл, та у день 4 додавали 10 Од/мл ІЛ-2 (Chiron, Херфілд, Велика Британія). Протягом 5 тижнів клітини щотижнево рестимулювали свіжими МКПК, змішаними з клітинами-респондерами у співвідношенні 1:1 і висівали на 24-лункові планшети у концентрації 3×10^6 /клітину.

Для отримання високоавідних Т-клітин інкубували приблизно 10^6 МКПК з HLA-A2/MAG-003-тетрамер-фікоеритрином (ФЕ) (отриманим у MBLI) протягом 30 хвилин за температури 37 °С, з наступним інкубуванням з антитілами до CD8-флуоресцеїнізотіоціанату (FITC)/алофікоціаніну (APC) на протязі 20 хвилин за температури 4 °С, яке супроводжувалося флуоресцентним сортуванням клітин (FACS) і аналізом на аналізаторі Calibur. Сортування проводили на приладі FACS-Vantage (Becton Dickinson, Коулі, Оксфорд, Велика Британія). Сортовані тетрамер-позитивні клітини висівали на 24-лункові планшети з використанням на кожну лунку 2×10^5 сортованих клітин, 2×10^6 опромінених A2-негативних МКПК як живильних клітин, 2×10^4 CD3/CD28 мікрогранул/мл (Dyna, Осло, Норвегія) та ІЛ-2 (1000 Од/мл). Отримані таким чином високоавідні Т-клітини були згодом використані для ідентифікації та виділення ТКР для визначення амінокислотних та ДНК-послідовностей і клонування у вектори експресії з використанням методів, добре відомих фахівцям у цій галузі.

Приклад 2

Імунізація мишей, трансгенних для МНС або ТКР людини

MAG-003 використовували для імунізації трансгенних мишей цілими локусами генів людини ТКР $\alpha\beta$ (1,1 і 0,7 млн. п. н.), Т-клітини яких експресують широкий спектр ТКР людини, які компенсують дефіцит ТКР у миші. (Li et al. 2010). Для отримання високоавідних Т-клітин інкубували МКПК, отримані від трансгенних мишей, з тетрамер-фікоеритрином (ФЕ) із подальшим сортуванням клітин як описано вище. Отримані таким чином високоавідні Т-клітини були згодом використані для ідентифікації та виділення ТКР для визначення амінокислотних та

ДНК-послідовностей і клонування у вектори експресії з використанням методів, добре відомих фахівцям у цій галузі.

В одному аспекті MAG-003 і його варіанти, тобто p286-1Y2L (які мають 2 амінокислотні заміни, SEQ ID NO: 2) і p286-1Y2L9L (які мають 3 амінокислотні заміни, SEQ ID NO: 3), виявляють потужну спорідненість до молекули HLA-A*0201 і стабільність що стосується неї. Зокрема, p286-1Y2L9L продемонстрував здатність індукувати специфічні ЦТЛ, які в одному з аспектів спричиняють лізис клітин-мішеней із МКПК як здорових донорів, так і HLA-A2.1 /Kb-трансгенних мишей. Див., наприклад, (Wu et al. 2011), вміст якої таким чином включений в цей документ шляхом посилання в усій повноті.

Для отримання високоавідних ТКР для комплексів МНС I або II/p286-1Y2L або p286-1Y2L9L ці пептиди можуть використовуватися у способах, описаних у Прикладах 1 і 2. Отримані таким чином високоавідні Т-клітини були згодом використані для ідентифікації та виділення ТКР для визначення амінокислотних та ДНК-послідовностей і клонування у вектори експресії з використанням методів, добре відомих фахівцям у цій галузі.

Високоавідні варіанти ТКР можна також вибрати з бібліотеки мутантних CDR дріжджовим, фаговим або Т-клітинним дисплеєм (holler et al. 2003; Li et al. 2005; Chervin et al. 2008). Отже, кандидати у варіанти ТКР забезпечують настанову для конструювання мутацій CDR Т-клітинних рецепторів для одержання високоавідних варіантів ТКР (Robbins et al. 2008; Zoete et al. 2007).

Приклад 3. Клонування ТКР

Методи клонування ТКР відомі в цій галузі, наприклад описані у патенті США 8 519 100, вміст якого що стосується згаданих методів таким чином включений в цей документ шляхом посилання в усій повноті. Олігонуклеотид A1, специфічний для послідовності варіабельної ділянки альфа-ланцюга, який кодує сайт рестрикції NdeI, введений метіонін для ефективного ініціювання експресії у бактерій, і олігонуклеотид A2, специфічний для послідовності константної ділянки альфа-ланцюга, який кодує сайт рестрикції Sall, використовуються для ампліфікації варіабельної ділянки альфа-ланцюга. У випадку бета-ланцюга для ампліфікації варіабельної ділянки бета-ланцюга використовуються специфічний для послідовності варіабельної ділянки бета-ланцюга олігонуклеотид, який кодує сайт рестрикції, наприклад NdeI, введений метіонін для ефективного ініціювання експресії у бактерій і олігонуклеотид B2, специфічний для послідовності константної ділянки бета-ланцюга, який кодує сайт рестрикції, наприклад AgeI.

Варіабельні ділянки альфа та бета були клоновані у експресійні плазмиди на основі pGMT7, які містять або C α , або C β , за допомогою стандартних методів, описаних у (Sambrook and Russell "Molecular Cloning a Laboratory Manual", Third edition). Плазмиди секвенували з використанням аналізатора ДНК 3730x1 (Applied Biosystems).

Послідовності ДНК, які кодують продукт розщеплення альфа-ланцюга ТКР за допомогою NdeI і Sall, лігували у вектор pGMT7+C α , який розщеплювали за допомогою NdeI і XhoI. Послідовності ДНК, які кодують продукт розщеплення бета-ланцюга ТКР за допомогою NdeI і AgeI, лігували в окремий вектор pGMT7+C β , який також розщеплювали за допомогою NdeI і AgeI. Отримані в результаті лігування плазмиди трансформують у компетентний штам *Escherichia coli* XL1-blue і висівають на чашки з агаром Лурія-Бертані, які містять 100 мкг/мл ампіциліну. Після інкубації протягом ночі за температури 37° С поодинокі колонії збирають і вирощують в 10 мл агару Лурія-Бертані, який містить 100 мкг/мл ампіциліну, протягом ночі за температури 37° С зі струшуванням. Клоновані плазмиди очищають за допомогою набору Miniprep (Qiagen), і вставки секвенують на автоматичному секвенаторі ДНК (Lark Technologies).

Приклад 4. Генетична інженерія аутологічних Т-клітин

Т-клітини отримують з метою експресії високоавідних ТКР (так звані лікарські препарати ТКР) або отримані із злитих білків химерні антигенні рецептори (CAR), які мають підвищену специфічність до антигена комплексу МНС I/MAG-003 або комплексу МНС II/MAG-003. В одному аспекті цей підхід знімає деякі обмеження, асоційовані з центральною і периферичною толерантністю і генерус Т-клітини, які є ефективнішими для націлювання на пухлини без необхідності активації Т-клітин пацієнта *de novo*.

Для отримання Т-клітин, що експресують ТКР за цим описом, нуклеїнові кислоти, які кодують ідентифіковані та виділені пухлиноспецифічні ТКР-альфа і (або) ТКР-бета ланцюги як описано у Прикладах 1–3, клонують у вектори експресії, такі як гамма-ретровірус або лентівірус. Реконбінантні віруси отримували, а потім перевіряли на функціональність, таку як специфічність до антигену і функціональну авідність. Аліквоту кінцевого продукту після цього використовують для трансдукції цільової популяції Т-клітин (як правило очищених від МКПК пацієнта), яку культивують перед введенням пацієнту.

Ланцюги ТКР, введені у периферичні Т-клітини, можуть конкурувати з ланцюгами ендогенних ТКР за асоціацію з CD3-комплексом, що необхідно для поверхневої експресії ТКР.

Оскільки високий рівень поверхневої експресії ТКР є суттєвим для забезпечення належної специфічності для ініціювання клітинами, які експресують пухлинний антиген-мішень (Cooper et al., 2000; Labrecque et al., 2001), стратегії, які підвищують рівні генної експресії ТКР-альфа і ТКР-бета, є важливим аспектом у генній терапії Т-клітинними рецепторами.

Для підвищення рівня експресії ТКР за цим описом у цьому описі можуть використовуватися потужні промотори, такі як довгі кінцеві повтори ретровірусу (LTR), цитомегаловірусу (CMV), вірусу стовбурових клітин мишей (MSCV) U3, фосфогліцераткіназа (PGK), бета-актин, убіквітин і композиційний промотор мавпячого вірусу 40 (SV40)/CD43 (Cooper et al., 2004; Jones et al., 2009), фактор елонгації (EF)-1a (Tsuji et al., 2005) і промотор вірусу некрозу селезінки (SFFV) (Joseph et al., 2008).

На додаток до сильних промоторів, численні касети експресії ТКР містять додаткові елементи, які можуть посилити трансгенну експресію, включаючи центральний поліпуриновий тракт (сРРТ), який сприяє ядерній транслокації лентівірусних конструкцій (Follenzi et al., 2000), посттранскрипційний регуляторний елемент вірусу гепатиту американських байбаків (wPRE), який підвищує рівень трансгенної експресії шляхом підвищення стабільності РНК (Zufferey et al., 1999).

Щоб досягти високого рівня поверхневої експресії ТКР, необхідно, щоб як альфа-, так і бета-ланцюги ТКР введеного ТКР транскрибувалися на високому рівні. Щоб досягти цього, альфа- і бета-ланцюги ТКР за цим описом можуть бути клоновані у біцистронні конструкції в одному векторі, які, як було показано, здатні подолати цю перешкоду. Використання ділянки внутрішньої посадки рибосоми вірусу (IRES) між альфа- і бета-ланцюгами ТКР приводить до координованої експресії обох ланцюгів, оскільки альфа- і бета-ланцюги ТКР утворюються з одного транскрипту, який розділяється на два білки в ході трансляції, забезпечуючи утворення рівних молярних співвідношень альфа- і бета-ланцюгів ТКР (Schmitt et al. 2009).

Іншою модифікацією, щодо якої отримані свідоцтва про її корисність для підвищення рівня трансгенної експресії ТКР, є оптимізація кодону. Надмірність генетичного коду дозволяє деяким кислотам кодуватися більш ніж одним кодоном, але певні кодони є менш "оптимальними" ніж інші внаслідок відносної наявності відповідних РНК, а також інших факторів (Gustafsson et al., 2004). Як було показано, модифікація послідовностей генів альфа- і бета-ланцюгів ТКР таким чином, щоб кожна амінокислота кодувалася оптимальним кодоном для експресії генів у ссавців, а також видалення мотивів нестабільності іРНК або прихованих сайтів сплайсингу, значно підвищує експресію генів альфа- і бета-ланцюгів ТКР (Scholten et al., 2006).

Крім того, порушення парування між введеними і ендogenous ланцюгами ТКР може привести до набуття таких видів специфічності, які становлять значний ризик для аутоімунності. Наприклад, утворення суміші димерів ТКР може знизити кількість молекул CD3, що доступні для утворення належним чином спарених комплексів ТКР, і у такий спосіб може значно зменшити функціональну авідність клітин, які експресують введені ТКР (Kuball et al., 2007).

Для зменшення порушень парування, С-кінцевий домен ланцюгів введеного ТКР за цим описом можна модифікувати, щоб підвищити взаємодію між ланцюгами, у той же час зменшити здатність введених ланцюгів утворювати пари з ендogenous ТКР. Ці підходи можуть включати заміну С-кінцевих доменів альфа- і бета-ланцюгів ТКР їх мишачими двійниками (наближений до мишачого С-кінцевий домен), утворюючи другий міжланцюговий дисульфідний зв'язок у С-кінцевому домені шляхом введення другого залишку цистеїну як у альфа-ланцюги ТКР, так і у бета-ланцюги ТКР введеного ТКР (цистеїнова модифікація); перестановку взаємодіючих залишків С-кінцевих доменів альфа- і бета-ланцюгів ТКР ("виступ-у-западину") і злиття варіабельних доменів альфа- і бета-ланцюгів ТКР безпосередньо з CD3 ζ (злиття CD3 ζ). (Schmitt et al. 2009).

Предметом цього опису є білки ТКР для лікування раку та інших пухлин, переважно недрібноклітинного раку легенів, які надмірно чи виключно презентують MAG-003.

Приклад 5. Генетична інженерія алогенних Т-клітин

Гамма-дельта ($\gamma\delta$) Т-клітини, які є нетрадиційними ефекторами Т-лімфоцитів, задіяними у першій лінії захисту від патогенів, можуть взаємодіяти з пухлинними клітинами і знищувати їх незалежно від МНС шляхом активації рецепторів, серед інших, ТКР-гамма ланцюгів і ТКР-дельта ланцюгів. Ці $\gamma\delta$ -Т-клітини виявляють попередньо активований фенотип, який забезпечує швидку продукцію цитокінів (ІФН-гамма, TNF-альфа) і сильну цитотоксичну відповідь після активації. Ці Т-клітини виявляють протипухлинну активність щодо багатьох видів раку і є свідченням того, що опосередкована $\gamma\delta$ Т-клітинами імунотерапія є здійсненою і може викликати об'єктивні протипухлинні відповіді. (Braza et al. 2013).

Недавні досягнення в галузі іммобілізованих антигенів, агоністичних моноклональних антитіл (мАт), отриманих із пухлин штучних антиген-презентуючих клітин (штучні АПК) або

комбінацій активуючих мАТ і штучних АПК дозволили досягнути успіх у культивуванні гамма-дельта Т-клітин зі спектром олігоклональних або поліклональних ТКР. Наприклад, іммобілізований білок А, пов'язаний із ланцюгом головного комплексу гістосумісності І класу, був стимулом для γδ Т-клітин, які експресують ізотипи ТКР-δ1, а зв'язані на чашках Петрі активувальні антитіла сприяли культивуванню клітин Vδ1 і Vδ2 ex vivo. Клінічно достатні кількості ТКР-δ1, ТКР-δ2 та ТКР-δ1^{нег}ТКР-δ2^{нег} були отримані після сумісного культивування на штучних АПК, і ці підтипи виявляли відмінність у фенотипі пам'яті і реактивності до пухлин in vitro та in vivo. (Deniger et al. 2014).

Крім того, γδ Т-клітини піддаються генній модифікації, про що свідчить введення альфа- і бета-ланцюгів ТКР (Hiasa et al. 2009). Інший аспект цього опису стосується продукції γδ Т-клітин, що експресують ТКР-альфа і ТКР-бета, які зв'язуються з MAG-003. Щоб досягти цього, γδ Т-клітини культивують методами, описаними у статті Deniger et al. 2014, з наступною трансдукцією рекомбінантних вірусів, що експресують ТКР, які зв'язуються з MAG-003 (як описано у Прикладі 3), в γδ Т-клітини після культивації. Трансдуковані вірусом γδ Т-клітини згодом вводять пацієнту.

Приклад 6. Дані з імуногенності і функціональних властивостей Т-клітин

Імуногенність MAG-003 досліджували за протоколами, які імітують процес виробництва фармацевтичного продукту. Спостерігалось праймування MAG-003-специфічних Т-клітин здорових донорів. Отримані Т-клітини виявилися здатними знищувати навантажені пептидом клітини-мішені, демонструючи свою функціональність. Дані продемонстрували, що 1) MAG-003 є імуногенною мішенню і 2) що отриманим Т-клітинам проти MAG-003 притаманна функціональна активність.

Отримані додаткові дані стали свідцтвами того, що MAG-003 є пептидом з дуже ефективним зв'язуванням з HLA-A*02:01.

Приклад 7. Експресія іРНК MAGEA4 у тканинах

Гібридизація in situ (ISH) використовується для виявлення експресії іРНК безпосередньо в фіксованих формаліном або заморожених зрізах тканини. Завдяки високій чутливості цього методу і його високій просторовій роздільній здатності він є придатним для визначення клітино-специфічної експресії мішені і розподілу або частоти експресії мішені поміж зрізами ракових тканин.

ISH здійснювали для виявлення іРНК MAGEA4 за технологією BaseScope™, розробленою компанією Advanced Cell Diagnostics (ACD). Технологія BaseScope™ базується на гібридизації від однієї до чотирьох пар олігонуклеотидних зондів Z-подібної форми до цільової послідовності. Ампліфікація сигналу досягається розгалуженою ампліфікацією ДНК, яка базується на багатократній ступеневій гібридизації нуклеотидів, зрештою побудувавши "дерево" розгалужених ланцюгів ДНК (рДНК). Кінець кінцем, велика кількість мічених зондів гібридизується до гілок "дерева" рДНК, і можна зафіксувати підсилений сигнал. Хромогенний набір для виявлення BaseScope™ Detection Kit (RED) включає мічені зонди, які зв'язані з ферментом (лужною фосфатазою). Виявлення сигналу залежить від ферментативного перетворення хромогенного субстрату FastRed, що додатково підсилює вихідний сигнал. BaseScope™ є дуже чутливою технологією, що пов'язано з ефективним процесом підсилення сигналу, у поєднанні з високою чутливістю та міцним зв'язуванням пар Z-зондів із іРНК-мішенню, навіть якщо вона частково утворила поперечні зв'язки або розкладалася. За свідченнями ACD, зв'язування однієї поодинокі пари зондів до кожної поодинокі молекули іРНК є достатнім для генерування виявлюваного сигналу ISH.

Кожний експеримент з ISH підрозділяється на два методологічних процеси: 1) попередня обробка тканин для демаскування мішені і 2) гібридизація мішені, підсилення і виявлення сигналу. Оптимальні умови попередньої обробки є критичними для успішного виявлення мішені у зрізах тканин FFPE (фіксованих формаліном і залитих у парафін). Процес фіксації викликає утворення поперечних зв'язків між молекулами білків, ДНК і РНК у клітинах і тканинах і таким чином маскує сайти гібридизації. Отже для забезпечення доступності іРНК-мішені і належного зв'язування набору зондів, ці поперечні зв'язки необхідно видалити перед гібридизацією мішені. Попередня обробка тканин включає три окремі етапи: 1) блокування ендогенної лужної фосфатази обробкою пероксидом водню, 2) демаскування мішені кип'ятінням у реагенті для демаскування мішені і 3) демаскування мішені розщепленням протеазою. Оскільки ступінь фіксації і утворення поперечних зв'язків може різнитися між різними блоками FFPE, оптимальні умови для демаскування мішені мають бути визначені експериментально для кожного окремого блока FFPE. Отже, зрізи тканин витримували протягом різних періодів кип'ятіння і розщеплення протеазою з наступною гібридизацією з набором зондів позитивного та негативного контролю. Оптимальні умови визначали шляхом мікроскопічного дослідження інтенсивності специфічного сигналу в позитивному контролі, неспецифічного фоновому сигналу в негативному контролі та

- морфології тканини. Попередню обробку тканин здійснювали відповідно до протоколів виробника. Реагенти для попередньої обробки входять у комплекти реагентів BaseScore™. Після завершення різних етапів попередньої обробки оцінювали експресію мішені шляхом гібридизації конкретного набору зондів із досліджуваною іРНК з наступним підсиленням сигналу від розгалуженої ампліфікації ДНК і виявленням хромогенного або флуоресцентного сигналу.
- 5 Усі аналізи здійснювали відповідно до протоколів виробника.

Таблиця 10

Аналіз експресії

Зразок	Тканина	Експресія MAGEA4
HNSCC062T1	Рак голови та шиї	++
HNSCC064T1	Рак голови та шиї	++
NSCLC004T1	Недрібноклітинний рак легенів	++
NSCLC006T1	Недрібноклітинний рак легенів	+
OC036T1	Рак яєчника	+

Сумарний рівень експресії MAGEA4 у відповідному зрізі: ± дуже низький, + низький або помірний, ++ високий, +++ дуже високий

10 Список посилань

- Adair SJ, Hogan KT (2009). Treatment of ovarian cancer cell lines with 5-aza-2'-deoxycytidine upregulates the expression of cancer-testis antigens and class I major histocompatibility complex-encoded molecules. *Cancer Immunol. Immunother.* 58, 589-601.
- Alves PM, Levy N, Bouzourene H, Viatte S, Bricard G, Ayyoub M, Vuilleumier H, Givel JC, Halkic N, Speiser DE, Romero P, Levy F (2007). Molecular and immunological evaluation of the expression of cancer/testis gene products in human colorectal cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 56, 839-847.
- Andrade VC, Vettore AL, Felix RS, Almeida MS, Carvalho F, Oliveira JS, Chauffaille ML, Andriolo A, Caballero OL, Zago MA, Colleoni GW (2008). Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients. *Cancer Immun.* 8, 2.
- 20 Aubry F, Satie AP, Rioux-Leclercq N, Rajpert-De ME, Spagnoli GC, Chomez P, De BO, Jegou B, Samson M (2001). MAGE-A4, a germ cell specific marker, is expressed differentially in testicular tumors. *Cancer* 92, 2778-2785.
- Bar-Haim E, Paz A, Machlenkin A, Hazzan D, Tirosh B, Carmon L, Brenner B, Vadai E, Mor O, Stein A, Lemonnier FA, Tzehoval E, Eisenbach L (2004). MAGE-A8 overexpression in transitional cell carcinoma of the bladder: identification of two tumour-associated antigen peptides. *Br. J Cancer* 91, 398-407.
- Barrow C, Browning J, MacGregor D, Davis ID, Sturrock S, Jungbluth AA, Cebon J (2006). Tumor antigen expression in melanoma varies according to antigen and stage. *Clin Cancer Res* 12, 764-771.
- 30 Bellati F, Napoletano C, Tarquini E, Palaia I, Landi R, Mancini N, Spagnoli G, Rugghetti A, Panici PB, Nuti M (2007). Cancer testis antigen expression in primary and recurrent vulvar cancer: association with prognostic factors. *Eur. J Cancer* 43, 2621-2627.
- Bergeron A, Picard V, LaRue H, Harel F, Hovington H, Lacombe L, Fradet Y (2009). High frequency of MAGE-A4 and MAGE-A9 expression in high-risk bladder cancer. *Int. J Cancer* 125, 1365-1371.
- 35 Bhan S, Chuang A, Negi SS, Glazer CA, Califano JA (2012). MAGEA4 induces growth in normal oral keratinocytes by inhibiting growth arrest and apoptosis. *Oncol Rep.* 28, 1498-1502.
- Bode PK, Thielken A, Brandt S, Barghorn A, Lohe B, Knuth A, Moch H (2014). Cancer testis antigen expression in testicular germ cell tumorigenesis. *Mod. Pathol.* 27, 899-905.
- 40 Cabezon T, Gromova I, Gromov P, Serizawa R, Timmermans W, V, Kroman N, Celis JE, Moreira JM (2013). Proteomic profiling of triple-negative breast carcinomas in combination with a three-tier orthogonal technology approach identifies Mage-A4 as potential therapeutic target in estrogen receptor negative breast cancer. *Mol. Cell Proteomics.* 12, 381-394.
- Cesson V, Rivals JP, Escher A, Piotet E, Thielemans K, Posevitz V, Dojcinovic D, Monnier P, Speiser D, Bron L, Romero P (2011). MAGE-A3 and MAGE-A4 specific CD4(+) T-cells in head and neck cancer patients: detection of naturally acquired responses and identification of new epitopes. *Cancer Immunol. Immunother.* 60, 23-35.
- 45

- Chambost H, Van BN, Brasseur F, Godelaine D, Xerri L, Landi SJ, Theate I, Plumas J, Spagnoli GC, Michel G, Coulie PG, Olive D (2000). Expression of gene MAGE-A4 in Reed-Sternberg cells. *Blood* 95, 3530-3533.
- Chen CH, Huang GT, Lee HS, Yang PM, Yan MD, Chen DS, Sheu JC (1999). High frequency of expression of MAGE genes in human hepatocellular carcinoma. 1999. *Liver* 19, 110-114.
- Chitale DA, Jungbluth AA, Marshall DS, Leitao MM, Hedvat CV, Kolb D, Spagnoli GC, Iversen K, Soslow RA (2005). Expression of cancer-testis antigens in endometrial carcinomas using a tissue microarray. *Mod. Pathol.* 18, 119-126.
- Coral S, Parisi G, Nicolay HJ, Colizzi F, Danielli R, Fratta E, Covre A, Taverna P, Sigalotti L, Maio M (2013). Immunomodulatory activity of SGI-110, a 5-aza-2'-deoxycytidine-containing demethylating dinucleotide. *Cancer Immunol. Immunother.* 62, 605-614.
- Cruz CR, Gerdemann U, Leen AM, Shafer JA, Ku S, Tzou B, Horton TM, Sheehan A, Copeland A, Younes A, Rooney CM, Heslop HE, Bollard CM (2011). Improving T-cell therapy for relapsed EBV-negative Hodgkin lymphoma by targeting upregulated MAGE-A4. *Clin Cancer Res* 17, 7058-7066.
- Cuffel C, Rivals JP, Zaugg Y, Salvi S, Seelentag W, Speiser DE, Lienard D, Monnier P, Romero P, Bron L, Rimoldi D (2011). Pattern and clinical significance of cancer-testis gene expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J Cancer* 128, 2625-2634.
- Daudi S, Eng KH, Mhawech-Fauceglia P, Morrison C, Miliotto A, Beck A, Matsuzaki J, Tsuji T, Groman A, Gnjjatic S, Spagnoli G, Lele S, Odunsi K (2014). Expression and immune responses to MAGE antigens predict survival in epithelial ovarian cancer. *PLoS. ONE.* 9, e104099.
- Duffour MT, Chaux P, Lurquin C, Cornelis G, Boon T, van der Bruggen P (1999). A MAGE-A4 peptide presented by HLA-A2 is recognized by cytolytic T lymphocytes. *Eur. J Immunol.* 29, 3329-3337.
- De PE, Arden K, Traversari C, Gaforio JJ, Szikora JP, De SC, Brasseur F, van der Bruggen P, Lethe B, Lurquin C, . (1994). Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics* 40, 360-369.
- Doyle JM, Gao J, Wang J, Yang M, Potts PR (2010). MAGE-RING protein complexes comprise a family of E3 ubiquitin ligases. *Mol Cell* 39, 963-974.
- Eng KH, Weir I, Tsuji T, Odunsi K (2015). Immunostimulatory/regulatory gene expression patterns in advanced ovarian cancer. *Genes and Cancer.*
- Forghanifard MM, Gholamin M, Farshchian M, Moaven O, Memar B, Forghani MN, Dadkhah E, Naseh H, Moghbeli M, Raeisossadati R, Abbaszadegan MR (2011). Cancer-testis gene expression profiling in esophageal squamous cell carcinoma: identification of specific tumor marker and potential targets for immunotherapy. *Cancer Biol Ther.* 12, 191-197.
- Gerdemann U, Katari U, Christin AS, Cruz CR, Tripic T, Rousseau A, Gottschalk SM, Savoldo B, Vera JF, Heslop HE, Brenner MK, Bollard CM, Rooney CM, Leen AM (2011). Cytotoxic T lymphocytes simultaneously targeting multiple tumor-associated antigens to treat EBV negative lymphoma. *Mol. Ther.* 19, 2258-2268.
- Gunda V, Cogdill AP, Bernasconi MJ, Wargo JA, Parangi S (2013). Potential role of 5-aza-2'-deoxycytidine induced MAGE-A4 expression in immunotherapy for anaplastic thyroid cancer. *Surgery* 154, 1456-1462.
- Gure AO, Chua R, Williamson B, Gonen M, Ferrera CA, Gnjjatic S, Ritter G, Simpson AJ, Chen YT, Old LJ, Altorki NK (2005). Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 11, 8055-8062.
- Hartmann S, Meyer TJ, Brands RC, Haubitz IR, Linz C, Seher A, Kubler AC, Muller-Richter UD (2015). MAGE-A expression clusters and antineoplastic treatment in head and neck cancer. *Int. J Mol. Med.* 35, 1675-1682.
- Hasegawa H, Mori M, Haraguchi M, Ueo H, Sugimachi K, Akiyoshi T (1998). Expression spectrum of melanoma antigen-encoding gene family members in colorectal carcinoma. *Arch. Pathol. Lab Med.* 122, 551-554.
- Hussein YM, Morad FE, Gameel MA, Emam WA, El Sawy WH, El Tarhouny SA, Bayomy ES, Raafat N (2012). MAGE-4 gene m-RNA and TGF in blood as potential biochemical markers for HCC in HCV-infected patients. *Med. Oncol* 29, 3055-3062.
- Jacobs JF, Grauer OM, Brasseur F, Hoogerbrugge PM, Wesseling P, Gidding CE, van de Rakt MW, Figdor CG, Coulie PG, de Vries IJ, Adema GJ (2008). Selective cancer-germline gene expression in pediatric brain tumors. *J Neurooncol.* 88, 273-280.
- Jia ZC, Ni B, Huang ZM, Tian Y, Tang J, Wang JX, Fu XL, Wu YZ (2010). Identification of two novel HLA-A*0201-restricted CTL epitopes derived from MAGE-A4. *Clin Dev. Immunol.* 2010, 567594.
- Kageyama S, Ikeda H, Miyahara Y, Imai N, Ishihara M, Saito K, Sugino S, Ueda S, Ishikawa T, Kokura S, Naota H, Ohishi K, Shiraishi T, Inoue N, Tanabe M, Kidokoro T, Yoshioka H, Tomura D,

Nukaya I, Mineno J, Takesako K, Katayama N, Shiku H (2015). Adoptive Transfer of MAGE-A4 T-cell Receptor Gene-Transduced Lymphocytes in Patients with Recurrent Esophageal Cancer. *Clin. Cancer Res.*

5 Kang J, Lee HJ, Kim J, Lee JJ, Maeng LS (2015). Dysregulation of X chromosome inactivation in high grade ovarian serous adenocarcinoma. *PLoS. ONE.* 10, e0118927.

Kawagoe H, Yamada A, Matsumoto H, Ito M, Ushijima K, Nishida T, Yakushiji M, Itoh K (2000). Serum MAGE-4 protein in ovarian cancer patients. *Gynecol. Oncol* 76, 336-339.

10 Kim K, Cho YM, Park BH, Lee JL, Ro JY, Go H, Shim JW (2015). Histological and immunohistochemical markers for progression prediction in transurethrally resected high-grade non-muscle invasive bladder cancer. *Int. J Clin Exp. Pathol.* 8, 743-750.

Kobayashi T, Lonchay C, Colau D, Demotte N, Boon T, van der Bruggen P (2003). New MAGE-4 antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on HLA-A1 tumor cells. *Tissue Antigens* 62, 426-432.

15 Kocher T, Zheng M, Bolli M, Simon R, Forster T, Schultz-Thater E, Remmel E, Noppen C, Schmid U, Ackermann D, Mihatsch MJ, Gasser T, Heberer M, Sauter G, Spagnoli GC (2002). Prognostic relevance of MAGE-A4 tumor antigen expression in transitional cell carcinoma of the urinary bladder: a tissue microarray study. *Int. J Cancer* 100, 702-705.

20 Kubuschok B, Xie X, Jesnowski R, Preuss KD, Romeike BF, Neumann F, Regitz E, Pistorius G, Schilling M, Scheunemann P, Izbicki JR, Lohr JM, Pfreundschuh M (2004). Expression of cancer testis antigens in pancreatic carcinoma cell lines, pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis. *Int. J Cancer* 109, 568-575.

Li J, Yang Y, Fujie T, Tanaka F, Mimori K, Haraguchi M, Ueo H, Mori M, Akiyoshi T (1997). Expression of the MAGE gene family in human gastric carcinoma. *Anticancer Res* 17, 3559-3563.

25 Li M, Yuan YH, Han Y, Liu YX, Yan L, Wang Y, Gu J (2005). Expression profile of cancer-testis genes in 121 human colorectal cancer tissue and adjacent normal tissue. *Clin Cancer Res* 11, 1809-1814.

Lifantseva N, Koltsova A, Krylova T, Yakovleva T, Poljanskaya G, Gordeeva O (2011). Expression patterns of cancer-testis antigens in human embryonic stem cells and their cell derivatives indicate lineage tracks. *Stem Cells Int.* 2011, 795239.

30 Luftl M, Schuler G, Jungbluth AA (2004). Melanoma or not? Cancer testis antigens may help. *Br. J Dermatol.* 151, 1213-1218.

Lin J, Lin L, Thomas DG, Greenson JK, Giordano TJ, Robinson GS, Barve RA, Weishaar FA, Taylor JM, Orringer MB, Beer DG (2004). Melanoma-associated antigens in esophageal adenocarcinoma: identification of novel MAGE-A10 splice variants. *Clin Cancer Res* 10, 5708-5716.

35 Liu W, Cheng S, Asa SL, Ezzat S (2008). The melanoma-associated antigen A3 mediates fibronectin-controlled cancer progression and metastasis. *Cancer Res* 68, 8104-8112.

Marcar L, Ihrig B, Hourihan J, Bray SE, Quinlan PR, Jordan LB, Thompson AM, Hupp TR, Meek DW (2015). MAGE-A Cancer/Testis Antigens Inhibit MDM2 Ubiquitylation Function and Promote Increased Levels of MDM4. *PLoS. ONE.* 10, e0127713.

40 Marcar L, Maclaine NJ, Hupp TR, Meek DW (2010a). Mage-A cancer/testis antigens inhibit p53 function by blocking its interaction with chromatin. *Cancer Res* 70, 10362-10370.

Marcar L, Maclaine NJ, Hupp TR, Meek DW (2010b). Mage-A cancer/testis antigens inhibit p53 function by blocking its interaction with chromatin. *Cancer Res* 70, 10362-10370.

45 Melo DH, Mamede RC, Neder L, Saggiaro FP, Figueiredo DL, da Silva WAJ, Jungbluth AA, Zago MA (2011). Expression of MAGE-A4 and MAGE-C1 tumor-associated antigen in benign and malignant thyroid diseases. *Head Neck* 33, 1426-1432.

50 Mischo A, Kubuschok B, Ertan K, Preuss KD, Romeike B, Regitz E, Schormann C, de BD, Wadle A, Neumann F, Schmidt W, Renner C, Pfreundschuh M (2006). Prospective study on the expression of cancer testis genes and antibody responses in 100 consecutive patients with primary breast cancer. *Int. J Cancer* 118, 696-703.

Mitchell RT, Camacho-Moll E, MacDonald J, Anderson RA, Kelnar CJ, O'Donnell M, Sharpe RM, Smith LB, Grigor KM, Wallace WH, Stoop H, Wolffenbuttel KP, Donat R, Saunders PT, Looijenga LH (2014). Intratubular germ cell neoplasia of the human testis: heterogeneous protein expression and relation to invasive potential. *Mod. Pathol.* 27, 1255-1266.

55 Miyahara Y, Naota H, Wang L, Hiasa A, Goto M, Watanabe M, Kitano S, Okumura S, Takemitsu T, Yuta A, Majima Y, Lemonnier FA, Boon T, Shiku H (2005). Determination of cellularly processed HLA-A2402-restricted novel CTL epitopes derived from two cancer germ line genes, MAGE-A4 and SAGE. *Clin Cancer Res* 11, 5581-5589.

Montoro JR, Mamede RC, Neder SL, Saggioro FP, Figueiredo DL, Silva WA, Jr., Jungbluth AA, Spagnoli GC, Zago MA (2012). Expression of cancer-testis antigens MAGE-A4 and MAGE-C1 in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 34, 1123-1128.

Monte M, Simonatto M, Peche LY, Bublik DR, Gobessi S, Pierotti MA, Rodolfo M, Schneider C (2006). MAGE-A tumor antigens target p53 transactivation function through histone deacetylase recruitment and confer resistance to chemotherapeutic agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 11160-11165.

Nagao T, Higashitsuji H, Nonoguchi K, Sakurai T, Dawson S, Mayer RJ, Itoh K, Fujita J (2003). MAGE-A4 interacts with the liver oncoprotein gankyrin and suppresses its tumorigenic activity. *J Biol Chem* 278, 10668-10674.

Naota H, Miyahara Y, Okumura S, Kuzushima K, Akatsuka Y, Hiasa A, Kitano S, Takahashi T, Yuta A, Majima Y, Shiku H (2006). Generation of peptide-specific CD8+T-cells by phytohemagglutinin-stimulated antigen-mRNA-transduced CD4+T-cells. *J Immunol. Methods* 314, 54-66.

Nishikawa H, Maeda Y, Ishida T, Gnjatich S, Sato E, Mori F, Sugiyama D, Ito A, Fukumori Y, Utsunomiya A, Inagaki H, Old LJ, Ueda R, Sakaguchi S (2012). Cancer/testis antigens are novel targets of immunotherapy for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 119, 3097-3104.

Nishimura S, Fujita M, Terata N, Tani T, Kodama M, Itoh K (1997). Expression of MAGE genes in colorectal carcinomas. *Nihon Rinsho Meneki. Gakkai Kaishi* 20, 95-101.

Oba-Shinjo SM, Caballero OL, Jungbluth AA, Rosemberg S, Old LJ, Simpson AJ, Marie SK (2008). Cancer-testis (CT) antigen expression in medulloblastoma. *Cancer Immun.* 8, 7.

Ohkuri T, Wakita D, Chamoto K, Togashi Y, Kitamura H, Nishimura T (2009). Identification of novel helper epitopes of MAGE-A4 tumor antigen: useful tool for the propagation of Th1 cells. *Br. J Cancer* 100, 1135-1143.

Ottaviani S, Colau D, van der Bruggen P, van der Bruggen P (2006). A new MAGE-4 antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on HLA-A24 carcinoma cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 55, 867-872.

Otte M, Zafrakas M, Riethdorf L, Pichlmeier U, Loning T, Janicke F, Pantel K (2001). MAGE-A gene expression pattern in primary breast cancer. *Cancer Res* 61, 6682-6687.

Peikert T, Specks U, Farver C, Erzurum SC, Comhair SA (2006). Melanoma antigen A4 is expressed in non-small cell lung cancers and promotes apoptosis. *Cancer Res* 66, 4693-4700.

Peng JR, Chen HS, Mou DC, Cao J, Cong X, Qin LL, Wei L, Leng XS, Wang Y, Chen WF (2005). Expression of cancer/testis (CT) antigens in Chinese hepatocellular carcinoma and its correlation with clinical parameters. *Cancer Lett.* 219, 223-232.

Perez D, Herrmann T, Jungbluth AA, Samartzis P, Spagnoli G, Demartines N, Clavien PA, Marino S, Seifert B, Jaeger D (2008). Cancer testis antigen expression in gastrointestinal stromal tumors: new markers for early recurrence. *Int. J Cancer* 123, 1551-1555.

Prasad ML, Jungbluth AA, Patel SG, Iversen K, Hoshaw-Woodard S, Busam KJ (2004). Expression and significance of cancer testis antigens in primary mucosal melanoma of the head and neck. *Head Neck* 26, 1053-1057.

Quillien V, Raoul JL, Heresbach D, Collet B, Toujas L, Bresseur F (1997). Expression of MAGE genes in esophageal squamous-cell carcinoma. *Anticancer Res.* 17, 387-391.

Rammensee HG, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50, 213-219.

Rammensee HG, Bachmann J, Stevanovic S (1997). *MHC Ligands and Peptide Motifs.* (Heidelberg, Germany: Springer-Verlag).

Resnick MB, Sabo E, Kondratiev S, Kerner H, Spagnoli GC, Yakirevich E (2002). Cancer-testis antigen expression in uterine malignancies with an emphasis on carcinosarcomas and papillary serous carcinomas. *Int. J Cancer* 101, 190-195.

Ries J, Schultze-Mosgau S, Neukam F, Diebel E, Wiltfang J (2005). Investigation of the expression of melanoma antigen-encoding genes (MAGE-A1 to-A6) in oral squamous cell carcinomas to determine potential targets for gene-based cancer immunotherapy. *Int. J Oncol.* 26, 817-824.

Roch N, Kutup A, Vashist Y, Yekebas E, Kalinin V, Izbickei JR (2010). Coexpression of MAGE-A peptides and HLA class I molecules in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 30, 1617-1623.

Saito T, Wada H, Yamasaki M, Miyata H, Nishikawa H, Sato E, Kageyama S, Shiku H, Mori M, Doki Y (2014). High expression of MAGE-A4 and MHC class I antigens in tumor cells and induction of MAGE-A4 immune responses are prognostic markers of CHP-MAGE-A4 cancer vaccine. *Vaccine* 32, 5901-5907.

Sakurai T, Itoh K, Higashitsuji H, Nagao T, Nonoguchi K, Chiba T, Fujita J (2004). A cleaved form of MAGE-A4 binds to Miz-1 and induces apoptosis in human cells. *J Biol Chem* 279, 15505-15514.

Sarcevic B, Spagnoli GC, Terracciano L, Schultz-Thater E, Heberer M, Gamulin M, Krajina Z, Oresic T, Separovic R, Juretic A (2003). Expression of cancer/testis tumor associated antigens in cervical squamous cell carcinoma. *Oncology* 64, 443-449.

Schirmer U, Fiegl H, Pfeifer M, Zeimet AG, Muller-Holzner E, Bode PK, Tischler V, Altevogt P (2013). Epigenetic regulation of L1CAM in endometrial carcinoma: comparison to cancer-testis (CT-X) antigens. *BMC. Cancer* 13, 156.

Shafer JA, Cruz CR, Leen AM, Ku S, Lu A, Rousseau A, Heslop HE, Rooney CM, Bollard CM, Foster AE (2010). Antigen-specific cytotoxic T lymphocytes can target chemoresistant side-population tumor cells in Hodgkin lymphoma. *Leuk. Lymphoma* 51, 870-880.

Sharma P, Shen Y, Wen S, Bajorin DF, Reuter VE, Old LJ, Jungbluth AA (2006). Cancer-testis antigens: expression and correlation with survival in human urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res* 12, 5442-5447.

Shichijo S, Hoshino T, Koufuji K, Hayashi A, Kawamoto M, Kikuchi M, Higuchi T, Ichiki M, Oizumi K, Itoh K (1997). Detection of MAGE-4 protein in sera of lung cancer patients. *Jpn. J Cancer Res* 88, 414-419.

Shigematsu Y, Hanagiri T, Shiota H, Kuroda K, Baba T, Mizukami M, So T, Ichiki Y, Yasuda M, So T, Takenoyama M, Yasumoto K (2010). Clinical significance of cancer/testis antigens expression in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 68, 105-110.

Shirakura Y, Mizuno Y, Wang L, Imai N, Amaike C, Sato E, Ito M, Nukaya I, Mineno J, Takesako K, Ikeda H, Shiku H (2012). T-cell receptor gene therapy targeting melanoma-associated antigen-A4 inhibits human tumor growth in non-obese diabetic/SCID/gammacnull mice. *Cancer Sci.* 103, 17-25.

Simpson AJ, Caballero OL, Jungbluth A, Chen YT, Old LJ (2005). Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev. Cancer* 5, 615-625.

Soga N, Hori Y, Yamakado K, Ikeda H, Imai N, Kageyama S, Nakase K, Yuta A, Hayashi N, Shiku H, Sugimura Y (2013). Limited expression of cancer-testis antigens in renal cell carcinoma patients. *Mol. Clin Oncol* 1, 326-330.

Su C, Xu Y, Li X, Ren S, Zhao C, Hou L, Ye Z, Zhou C (2015). Predictive and prognostic effect of CD133 and cancer-testis antigens in stage Ib-IIIa non-small cell lung cancer. *Int. J Clin Exp. Pathol.* 8, 5509-5518.

Takahashi N, Ohkuri T, Homma S, Ohtake J, Wakita D, Togashi Y, Kitamura H, Todo S, Nishimura T (2012). First clinical trial of cancer vaccine therapy with artificially synthesized helper/killer-hybrid epitope long peptide of MAGE-A4 cancer antigen. *Cancer Sci.* 103, 150-153.

Tahara K, Mori M, Sadanaga N, Sakamoto Y, Kitano S, Makuuchi M (1999b). Expression of the MAGE gene family in human hepatocellular carcinoma 1999. *Cancer* 85, 1234-1240.

Tanaka F, Mori M, Li J, Fujie T, Mimori K, Haraguchi M, Tanaka Y, Mafune K, Akiyoshi T (1997). High frequency of the expression of the MAGE gene family in human esophageal carcinoma. *Int. J Oncol* 10, 1113-1117.

Tsuzurahara S, Sata M, Iwamoto O, Shichijo S, Kojiro M, Tanikawa K, Itoh K (1997). Detection of MAGE-4 protein in the sera of patients with hepatitis-C virus-associated hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis. *Jpn. J Cancer Res* 88, 915-918.

Wang M, Li J, Wang L, Chen X, Zhang Z, Yue D, Ping Y, Shi X, Huang L, Zhang T, Yang L, Zhao Y, Ma X, Li D, Fan Z, Zhao L, Tang Z, Zhai W, Zhang B, Zhang Y (2015). Combined cancer testis antigens enhanced prediction accuracy for prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Int. J Clin Exp. Pathol.* 8, 3513-3528.

Wilson EM (2010). Androgen receptor molecular biology and potential targets in prostate cancer. *Ther. Adv. Urol.* 2, 105-117.

Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF (2013). Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 31, 3997-4013.

Wong PP, Yeoh CC, Ahmad AS, Chelala C, Gillett C, Speirs V, Jones JL, Hurst HC (2014). Identification of MAGEA antigens as causal players in the development of tamoxifen-resistant breast cancer. *Oncogene* 33, 4579-4588.

Wu ZY, Gao YF, Wu YH, Liu W, Sun M, Zhai MX, Qi YM, Ye Y (2011). Identification of a novel CD8+T-cell epitope derived from cancer-testis antigen MAGE-4 in oesophageal carcinoma. *Scand. J Immunol.* 74, 561-567.

Yakirevich E, Sabo E, Lavie O, Mazareb S, Spagnoli GC, Resnick MB (2003). Expression of the MAGE-A4 and NY-ESO-1 cancer-testis antigens in serous ovarian neoplasms. *Clin Cancer Res* 9, 6453-6460.

Yang B, O'Herrin SM, Wu J, Reagan-Shaw S, Ma Y, Bhat KM, Gravekamp C, Setaluri V, Peters N, Hoffmann FM, Peng H, Ivanov AV, Simpson AJ, Longley BJ (2007). MAGE-A, mMage-b, and MAGE-C proteins form complexes with KAP1 and suppress p53-dependent apoptosis in MAGE-positive cell lines. *Cancer Res* 67, 9954-9962.

5 Yamada R, Takahashi A, Torigoe T, Morita R, Tamura Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Kubo T, Watarai K, Kondo T, Hirohashi Y, Sato N (2013). Preferential expression of cancer/testis genes in cancer stem-like cells: proposal of a novel sub-category, cancer/testis/stem gene. *Tissue Antigens* 81, 428-434.

10 Yoshida N, Abe H, Ohkuri T, Wakita D, Sato M, Noguchi D, Miyamoto M, Morikawa T, Kondo S, Ikeda H, Nishimura T (2006). Expression of the MAGE-A4 and NY-ESO-1 cancer-testis antigens and T-cell infiltration in non-small cell lung carcinoma and their prognostic significance. *Int. J Oncol* 28, 1089-1098.

15 Zhang Y, Stroobant V, Russo V, Boon T, van der Bruggen P (2002). A MAGE-A4 peptide presented by HLA-B37 is recognized on human tumors by cytolytic T lymphocytes. *Tissue Antigens* 60, 365-371.

20 Zimmermann AK, Imig J, Klar A, Renner C, Korol D, Fink D, Stadlmann S, Singer G, Knuth A, Moch H, Caduff R (2013). Expression of MAGE-C1/CT7 and selected cancer/testis antigens in ovarian borderline tumours and primary and recurrent ovarian carcinomas. *Virchows Arch.* 462, 565-574.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

25 1. Застосування пептиду, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 1, або його фармацевтично прийнятної солі у виробництві лікарського засобу для лікування раку, вибраного з групи, яка складається з недрібноклітинного раку легень та дрібноклітинного раку легень.

30 2. Застосування антитіла, яке специфічно розпізнає пептид, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 1, у виробництві лікарського засобу для лікування раку, вибраного з групи, яка складається з недрібноклітинного раку легень та дрібноклітинного раку легень.

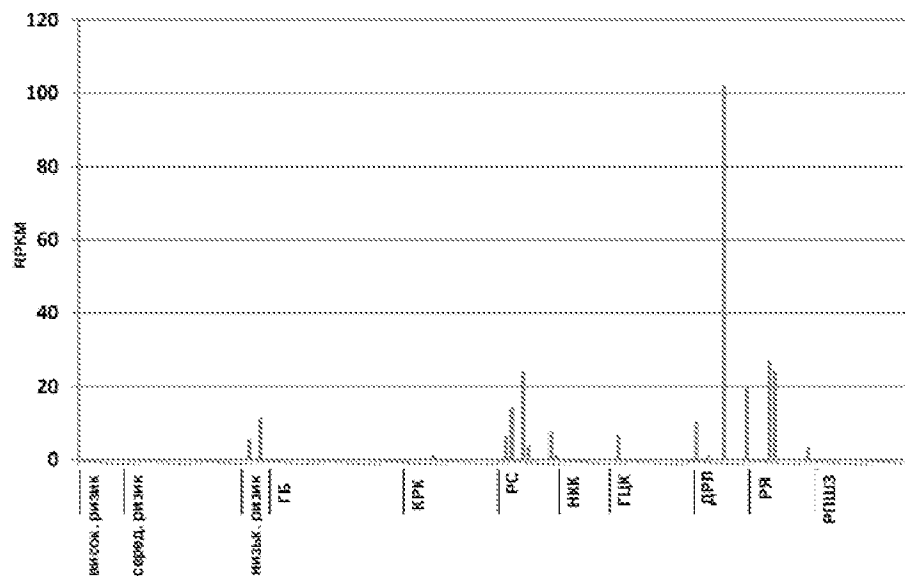
3. Застосування за п. 2, де антитіло являє собою розчинне або зв'язане з мембраною антитіло.

4. Застосування за п. 2 або 3, де антитіло специфічно зв'язується з пептидом, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 1, якщо він зв'язаний з молекулою МНС.

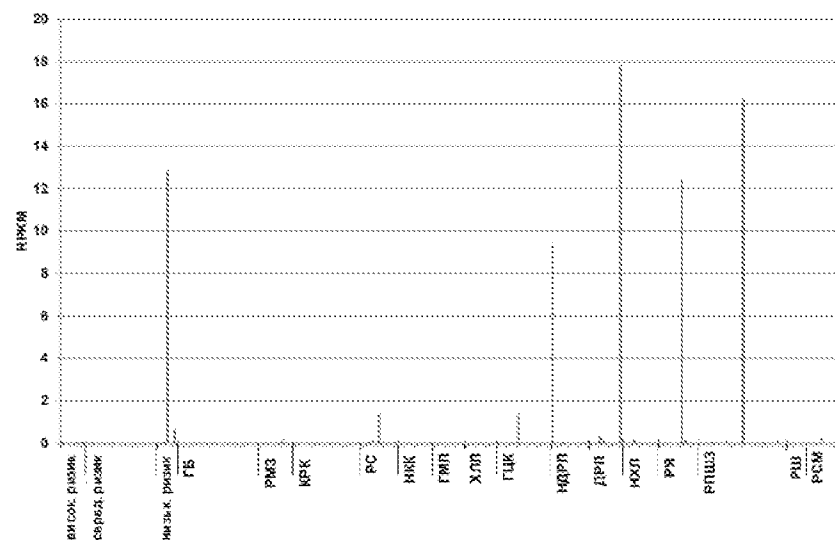
35 5. Застосування Т-клітинного рецептора (ТКР) або його функціонального фрагмента, що реагує з лігандом HLA, де згаданий ліганд складається з пептиду, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 1, у виробництві лікарського засобу для лікування раку, вибраного з групи, яка складається з недрібноклітинного раку легень та дрібноклітинного раку легень.

40 6. Застосування Т-клітинного рецептора або його функціонального фрагмента за п. 5, де згаданий Т-клітинний рецептор або його функціональний фрагмент являє собою зв'язаний з мембраною Т-клітинний рецептор.

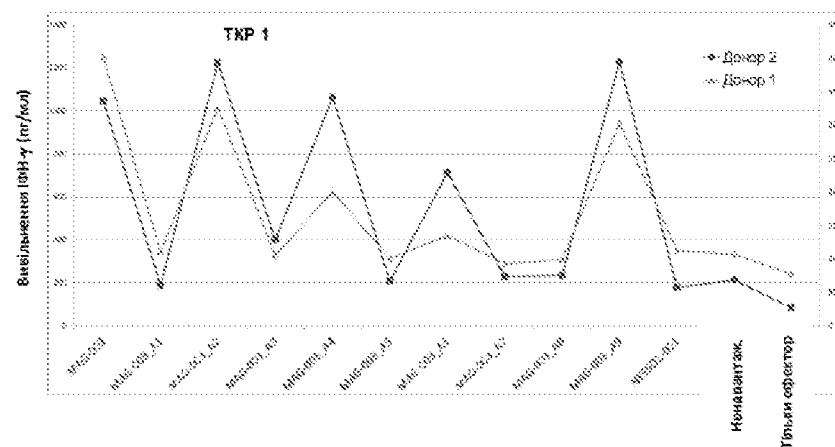
7. Застосування Т-клітинного рецептора або його функціонального фрагмента за п. 5, де згаданий Т-клітинний рецептор або його функціональний фрагмент представлений у вигляді розчинної молекули.



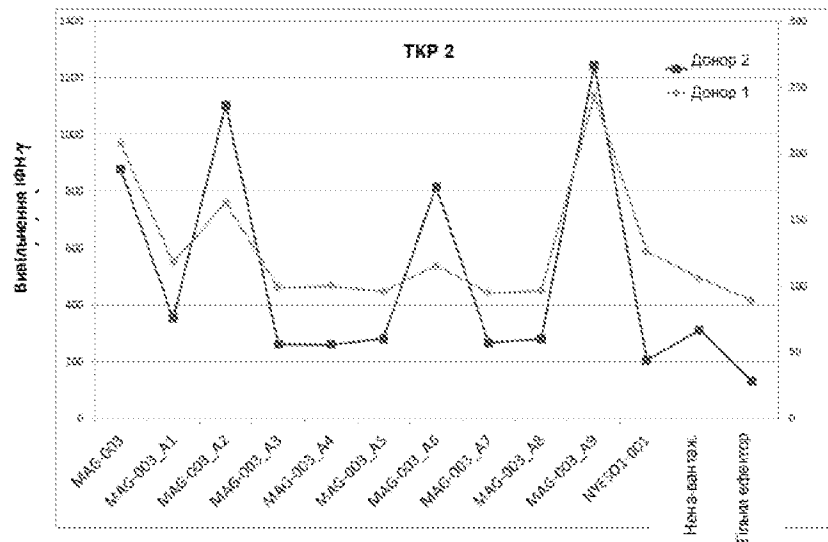
Фігура 1



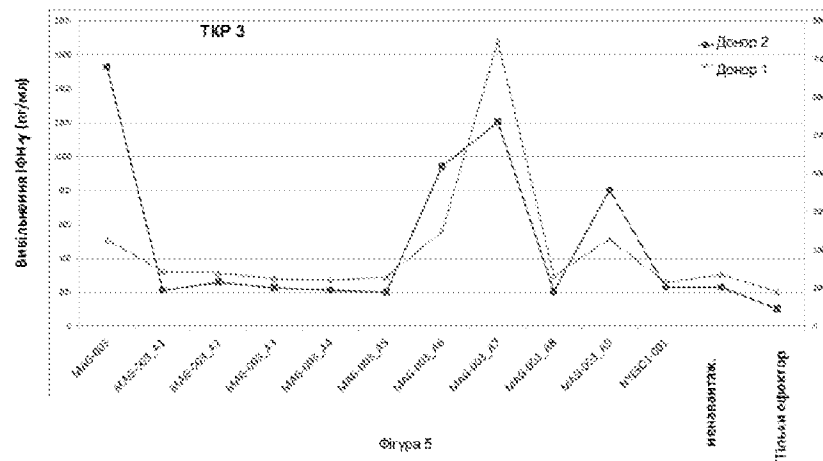
Фігура 2



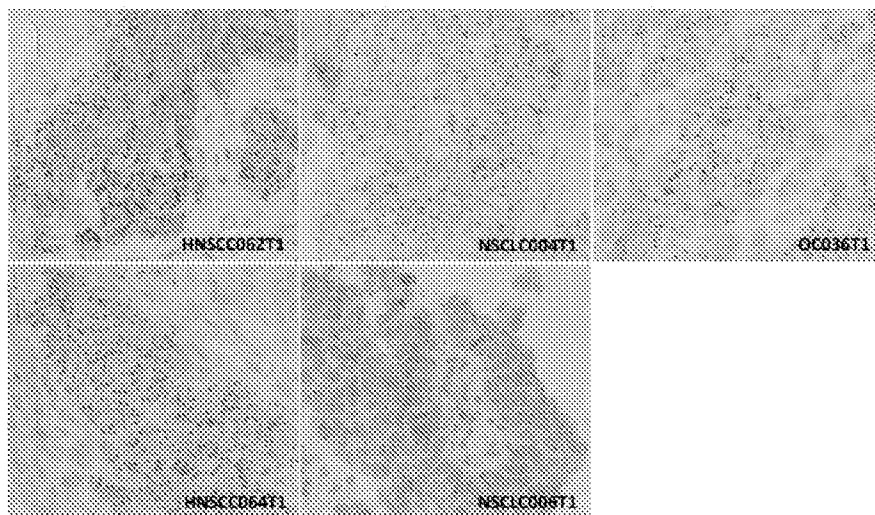
Фігура 3



Фігура 4



Фігура 5



Фігура 6