



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **124519** (13) **C2**
(51) МПК (2021.01)**C07K 14/47** (2006.01)**C12N 15/12** (2006.01)**A61K 38/08** (2019.01)**A61K 38/17** (2006.01)

A61P 35/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

(21) Номер заявки: а 2017 08037	(72) Винахідник(и): Мар Андреа (DE), Вайншенк Тоні (DE), Шор Олівер (DE), Фрітше Йенс (DE), Сінгх Харпреет (US), Зонг Колетт (DE)
(22) Дата подання заявки: 24.03.2016	(73) Володілець (володільці): ІММАТІКС БІОТЕКНОЛОДЖІС ГМБХ, Paul-Ehrlich-Straße 15, 72076 Tübingen, Germany (DE)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 06.10.2021	(74) Представник: Шпакович Тетяна Іванівна, реєстр. №240
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 1505585.8, 62/140,767	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2004048599 A2, 10.06.2004 WO 9814466 A1, 09.04.1998 US 2005106644 A1, 19.05.2005 WO 2007114954 A2, 11.10.2007 US 2010029573 A1, 04.02.2010 WO 2004085461 A2, 07.10.2004 WO 2009015842 A2, 05.02.2009 EP 1760089 A1, 07.03.2007 Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines / T. Weinschenk, C. Gouttefangeas, M. Schirle et al. // Cancer Research. – 2002. - Vol. 62 (20). - P. 5818– 5827 Lessons to be learned from primary renal cell carcinomas: novel tumor antigens and HLA ligands for immunotherapy / T. Krüger, O. Schoor, C. Lemmel et al. // Cancer Immunology Immunotherapy. - 2005. - Vol. 54 (9). - P. 826–836 MAGED4-expression in renal cell carcinoma and identification of an HLA-A*25-restricted MHC class I ligand from solid tumor tissue / B.F. Krämer, O. Schoor, T. Krüger et al. // Cancer Biology & Therapy. – 2005.- Vol. 4 (9). -P. 943-948
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 31.03.2015, 31.03.2015	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: GB, US	
(41) Публікація відомостей про заявку: 25.01.2018, Бюл.№ 2	
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 05.10.2021, Бюл.№ 40	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ PCT/EP2016/056601, 24.03.2016	

(54) ПЕПТИД, ЗДАТНИЙ ЗВ'ЯЗУВАТИСЯ З МОЛЕКУЛОЮ ГОЛОВНОГО КОМПЛЕКСУ ГІСТОСУМІСНОСТІ (МНС) ЛЮДИНИ І КЛАСУ**(57) Реферат:**

Винахід стосується пептиду, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 12, або його фармацевтично прийнятної солі, причому згаданий пептид здатний зв'язуватися з молекулою головного комплексу гістосумісності (МНС) людини І класу. Також винахід стосується Т-клітинного рецептора (ТКР), нуклеїнової кислоти, рекомбінантної клітини-хазіяна,

UA 124519 C2

способу отримання пептиду та ТКР, активованої Т-клітини, застосування пептиду та ТКР у діагностиці або лікуванні раку, який виявляє надмірну експресію білка SEMA5B, фармацевтичної композиції та терапевтичного комплексу.

Цей 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* і переносити їх 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 винахід стосується декількох нових пептидних послідовностей та їх варіантів, отриманих із молекул HLA I класу пухлинних клітин людини, які можуть застосовуватися у вакцинних композиціях з метою викликати протипухлинну імунну відповідь або являють собою мішені для розробки фармацевтично або імунологічно активних сполук і клітин.

ПЕРЕДУМОВА СТВОРЕННЯ ВИНАХОДУ

Рак нирки більш поширений серед чоловіків, ніж у жінок, і є дев'ятим за поширеністю видом раку у чоловіків (214 000 випадків) і 14-м у жінок (124 000 випадків) в усьому світі у 2012 році. 70 % нових випадків виявлено у країнах з високим і дуже високим рівнем розвитку людського потенціалу, з приблизно 34 % нових випадків у Європі і 19 % у Північній Америці. За приблизною оцінкою, кількість смертей від раку нирки у 2012 році сягала 143 000 (91 000 у чоловіків і 52 000 у жінок), рак нирки є 16-м серед причин смерті від ракових захворювань в усьому світі.

Найвища захворюваність виявлена у Чеській Республіці. Підвищена захворюваність також зареєстрована у Північній і Східній Європі, Північній Америці і Австралії. Низькі показники захворюваності виявлені у більшості країн Африки і Східної Азії. Показник летальності у високорозвинених країнах (коефіцієнт співвідношення смертності і захворюваності, який дорівнює 0,4) нижче, ніж у країнах і низьким і середнім рівнями розвитку людського потенціалу (0,5). Лише 3,1 % випадків було діагностовано у Африці, але 5,7 % смертей спостерігалось у цьому регіоні. Показники захворюваності і смертності зростають у багатьох країнах з різними рівнями розвитку людського потенціалу (World Cancer Report, 2014).

Більшість випадків раку нирки є нирково-клітинними карциномами (НKK), які є неоднорідним класом пухлин, що розвиваються з різних видів клітин паренхіми нирки. Більшість є світлоклітинними нирково-клітинними карциномами (приблизно 70 % від випадків раку нирки), а якими слідує папілярні (10-15 %), хромофобні (близько 5 %) карциноми і карциноми збиральних протоків (<1 %). Кожний із цих підтипів нирково-клітинної карциноми характеризується притаманними йому генетичними характеристиками (Moch, 2013; World Health Organization Classification of Tumours, 2004).

Нирково-клітинна карцинома (НKK) характеризується відсутністю ранніх попереджувальних ознак, різноманітними клінічними проявами і резистентністю до дії випромінювання та хіміотерапії. Загалом 25–30 % пацієнтів із НKK вперше звертаються по допомогу з очевидними метастазами (Hofmann et al., 2005). Приблизно у третій частині пацієнтів із НKK згодом розвивається метастатична хвороба. Таким чином, у приблизно 50–60 % усіх пацієнтів із НKK кінець кінцем розвивається метастатична хвороба (Bleumer et al., 2003; Hofmann et al., 2005). Серед хворих із метастазами у приблизно 75 % спостерігаються метастази у легені, у 36 % - у лімфовузлах і (або) з розповсюдженням на м'які тканини, у 20 % - у кістки і у 18 % - у печінку (Sachdeva et al., 2010).

Пацієнти з НKK з метастатичною хворобою, які отримують системну терапію першої лінії на основі цитокінів, можна розділити на групи ризику, що передбачають виживаність, на основі 5 прогностичних факторів (Motzer et al., 2004). Характеристиками стану до лікування, які асоціюються з короткою виживаністю, є низький індекс Карнофського (<80 %), висока активність сироваткової лактатдегідрогенази (>1,5 ВМН), низький вміст гемоглобіну (<НМН), високий скоригований вміст сироваткового кальцію (>10 мг/дл) і час від встановлення первинного діагнозу до початку системної терапії <1 року. Виходячи з цих факторів ризику, пацієнтів поділяли на три групи ризику. Медіана часу до смерті у 18 % пацієнтів з нульовими факторами ризику (сприятливий ризик) становила 30 місяців. 62 % пацієнтів мали один або два фактори ризику (проміжний ризик), а медіана тривалості виживання у цій групі становила 14 місяців. Пацієнти з трьома або більше факторами ризику (високий ризик), які становили 20 % пацієнтів, мали медіану тривалості виживання 5 місяців. Ця класифікація груп ризику за шкалою MSKCC широко застосовується у клінічних іспитах для поширеної НKK. Категоризація за ризиком може використовуватися при плануванні і інтерпретації результатів клінічних випробувань і спрямуванні терапії.

Факторами ризику при НКК є паління сигарет і ожиріння. Різні метааналізи підтвердили, що паління у будь-який період життя підвищує ризик розвитку раку нирки у порівнянні з тими, хто ніколи не палив (Cho et al., 2011; Hunt et al., 2005). Також існує дозо-залежне зростання ризику що стосується кількості сигарет, які людина випалює щодня. Ризик зменшується на протязі 5 років після того, як людина кинула палити. Надмірна вага, особливо ожиріння, є фактором ризику виникнення раку нирки як у жінок, так і у чоловіків (Ljungberg et al., 2011). За оцінкою, частка усіх випадків раку нирки, причиною якого вважають надмірну вагу і ожиріння, становить приблизно 40 % у США і аж до 40 % у європейських країнах (Renehan et al., 2008; Renehan et al., 2010). Механізм, за яким ожиріння впливає на канцерогенез раку нирки, залишається неясним. Статеві стероїдні гормони можуть впливати на проліферацію клітин нирки за рахунок безпосередніх ендокринних ефектів, медіаторами яких є рецептори. Ожиріння у поєднанні з ендокринними порушеннями, такими як знижений рівень глобуліну і прогестерону, що зв'язують статеві гормони, резистентність до інсуліну і підвищені рівні факторів росту, таких як інсуліноподібний фактор росту 1 (IGF-1), можуть відігравати певну роль у канцерогенезі раку нирки. Нещодавно у дослідженні випадок–контроль повідомлялося про дуже тісний взаємозв'язок між світлоклітинною карциномою і ожирінням (World Cancer Report, 2014).

Первинним лікуванням найчастіше є часткове або повне видалення ураженої(-их) нирки(-ок), яке залишається основою радикального лікування (Rini et al., 2008). Для терапії першої лінії пацієнтів з низьким прогностичним індексом настанова, запропонована декількома онкологічними організаціями і товариствами, рекомендує застосування інгібіторів білка рецепторного типу тирозинкінази (ІТК), сунітинібу (сутент®) і пазопанібу (вотриент®), моноклонального антитіла бевацизумабу (авастин®) у комбінації з інтерфероном-альфа (ІФН-альфа) і інгібітором mTOR темзіролімусом (торизел®). Виходячи з настанови з клінічної практики в онкології NCCN, розробленої у США, а також настанов Європейської асоціації урологів EAU і Європейського товариства медичної онкології ESMO, ІТК сорафеніб, пазопаніб або нещодавно акситиніб рекомендовані як терапія другої лінії для пацієнтів із НКК у разі неефективності попереднього лікування цитокінами (ІФН-альфа, ІЛ-2). Настанови NCCN радять також застосовувати сунітиніб за такого перебігу хвороби (докази високого рівня відповідно до NCCN, Категорія I).

Еверолімус і акситиніб рекомендуються як засоби терапії другої лінії для тих пацієнтів, які не отримали користь від терапії ІТК, спрямованої на фактор росту ендотелію судин, відповідно до установлених рекомендацій.

Відома імуногенність НКК є підставою для застосування імунотерапії і протиракових вакцин за поширеної форми НКК.

Цікавий факт кореляції між експресією PD-1 лімфоцитами і пізніми стадіями НКК, її ступеню злоякісності і прогнозом перебігу, а також селективною експресією PD-L1 пухлинними клітинами НКК і її можливого зв'язку з гіршими клінічними результатами привели до розробки нових засобів проти PD-1/PD-L1, які самостійно або в комбінації з анти-ангіогенними лікарськими засобами або іншими імунотерапевтичними підходами можуть застосовуватися для лікування НКК (Massari et al., 2015).

У хворих з поширеною формою НКК у дослідженні фази III протиракової вакцини під назвою TRIST оцінюється, чи може TroVax (вакцина з використанням пухлино-асоційованого антигену, 5T4, із вектором на основі поксвірусу), додана до стандарту терапії першої лінії, подовжити виживання пацієнтів з місцево-поширеною або метастатичною НКК. Медіана виживаності не була досягнута в жодній групі із 399 пацієнтів (54 %), що залишилися у дослідженні, проте аналіз даних підтвердив попередні клінічні результати, продемонструвавши, що TroVax є імунологічно активною, так само як і те, що існує кореляція між інтенсивністю відповіді 5T4-специфічних антитіл і покращенням виживаності. Також проводяться декілька досліджень з пошуку пептидних вакцин з використанням епітопів, що надлишково експресуються у НКК.

Досліджувалися різні підходи до створення протипухлинних вакцин. На пацієнтах із НКК були проведені дослідження із застосуванням цілісних компонентів пухлин, включаючи лізати пухлинних клітин, злиття дендритних клітин з клітинами пухлини або РНК цільних клітин. У деяких із цих випробувань спостерігалася ремісія пухлинних уражень (Avigan et al., 2004; Holtl et al., 2002; Marten et al., 2002; Su et al., 2003; Wittig et al., 2001).

У останні роки шляхом клонування/експресії, підходу зворотної імунології або з використанням методики ДНК-мікročіпів були визначені і охарактеризовані декілька ТАА людини, які експресуються у НКК і розпізнаються ЦТЛ (Dannenmann et al., 2013; Michael and Pandha, 2003; Minami et al., 2014; Renkvist et al., 2001; Wiernecky et al., 2006).

Зважаючи на важкі побічні ефекти і витрати, пов'язані з лікуванням раку, існує потреба ідентифікувати фактори, які можливо буде використовувати для лікування раку взагалі і НКК

зокрема. Є також потреба в ідентифікації інших чинників, які виконують роль біомаркерів раку взагалі і НСК зокрема, які забезпечать кращу діагностику раку, оцінку прогнозу і передбачення успіху лікування.

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 головні 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.

е) 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 глікозилування, 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.

ф) 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, E6 і E7, 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 тримірна 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 розщеплення протеолітичними ферментами переважно ендогенних 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 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, такі як 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 винаходом 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 імунітеті. 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 ангиогенезу за рахунок секреції інтерферону-гамма (ІФН-γ) (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., 2014a).

Оскільки конститутивна експресія молекул HLA II класу зазвичай обмежується клітинами імунної системи, раніше вважалося 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 щільною молекулою МНС. У такий спосіб кожний алель

МНС має "зв'язувальний мотив", що визначає, які пептиди зможуть специфічно зв'язатися зі зв'язувальною щільною.

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 розпізнаватися Т-клітинами, що несуть специфічний Т-клітинний рецептор (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 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*.

По суті, будь-який пептид, що здатний зв'язуватися з молекулою МНС, може відігравати роль епітопу Т-клітини. Передумовою індукції відповіді Т-клітин *in vitro* або *in vivo* є присутність Т-клітин із відповідним ТКР і відсутність імунологічної толерантності до цього конкретного епітопу.

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 винаходом імуногенність базових пептидів є вторинною. У цих випадках визначальним фактором є презентація

КОРОТКЕ ФОРМУЛЮВАННЯ СУТНОСТІ ВИНАХОДУ

Згідно з першим аспектом цього винаходу, пропонується пептид, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи послідовностей від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 114 або варіант його послідовності, який принаймні на 77 %, переважно принаймні на 88 % гомологічний (переважно принаймні на 77 % або принаймні на 88 % ідентичний) послідовності від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 114, де згаданий варіант зв'язується з МНС і (або) викликає перехресну реакцію Т-клітин із згаданим пептидом або його фармацевтично прийнятною сіллю, де згаданий пептид не є базовим повнорозмірним поліпептидом.

Цей винахід також стосується пептиду, що містить послідовність, вибрану з групи послідовностей від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 114 або його варіанту, який принаймні на 77 %, переважно принаймні на 88 % гомологічний (переважно принаймні на 77 % або принаймні на 88 % ідентичний) послідовності від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 114, 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.

У нижче наведеній таблиці описані пептиди за цим винаходом, їх відповідні SEQ ID NO і очікувані вихідні (основні) гени для пептидів. Усі пептиди у Таблиці 1 і Таблиці 2 зв'язуються з HLA-A*02. Пептиди Таблиці 2 були розкриті раніше у великих списках як результати високопродуктивного скринінгу з великою частотою помилок або були розраховані з використанням алгоритмів, але їхній зв'язок з раковими захворюваннями взагалі не був встановлений. Пептиди, наведені у Таблиці 3, є додатковими пептидами, які доцільно використовувати у комбінації з іншими пептидами за винаходом. Наведені у Таблицях 4А і Б пептиди також можуть використовуватися в діагностиці і (або) лікуванні різних інших злоякісних пухлин, пов'язаних з надмірною експресією або надмірною презентацією відповідного базового поліпептиду.

Таблиця 1

Пептиди за цим винаходом

SEQ ID No	Послідовність	Ід. номер(и) гена(ів)	Символ(и) гена(ів)
1	ALIVSLPYL	10786	SLC17A3
2	ILWREVVT	3299	HSF4
3	RLLGEVQAL	3299	HSF4
4	FLSQDIITV	5972	REN
5	YLYPNLTRL	6540	SLC6A13
6	VLFELSKTV	23250	ATP11A
7	FLLSLIDRL	112399	EGLN3
8	GLASFKSFL	8490	RGS5
9	ILLQKPDSV	8490	RGS5
10	KLLQNNYGL	8490	RGS5
11	FIQTEAPKEV	8490	RGS5
12	ALDPGSQLI	54437	SEMA5B
13	KIMAQILTV	120892	LRRK2
14	ALLTETIFL	120892	LRRK2
15	ILIKHLVKV	143872	ARHGAP42
16	FMPEELPQL	55258	THNSL2
17	ILAQQVHAL	113220	KIF12
18	YVLDLAAKV	47	ACLY
19	LLDPGSLQL	646658	SYNDIG1L
20	AVANTTFTV	80270	HSD3B7
21	RLIQGDQILSV	10207	INADL
22	FLSPPLPSV	593, 641649	BCKDHA, TMEM91
23	YIQEVVQYI	23236	PLCB1
24	FTLGTTVFL	4717	NDUFC1
25	LLVPAHLVAA	11082	ESM1
26	SLMEILYTL	91949	COG7
27	SLSDLLVSL	23596	OPN3
28	FIADLVVGL	2023, 2026, 2027	ENO1, ENO2, ENO3
29	ILLDLEQAL	9820	CUL7
30	QLFYTKIFL	5351	PLOD1
31	VLFGLDPAVIKV	259217	HSPA12A
32	FLAGGIRGSGA	113730	KLHDC7B
33	FIADVVEKI	5654, 94031	HTRA1, HTRA3

Пептиди за цим винаходом

SEQ ID No	Послідовність	Ід. номер(и) гена(ів)	Символ(и) гена(ів)
34	ELNNQNFYL	11113	CIT
35	VLHSLQTQL	51129	ANGPTL4
36	SLFGKKYIL	2274	FHL2
37	VLAPVILML	8714	ABCC3
38	VLLDTILQL	11077	HSF2BP
39	YLLNLNHLGL	23471	TRAM1
40	YIQEHLLQI	10625	IVNS1ABP
41	GLLKTQLKL	25932	CLIC4
42	VILDTGTIQL	9027	NAT8
43	YLKDELDEL	23255	SOGA2
44	ALFSFVTAL	80727	TTYH3
45	ALLGIPLTL	3777, 60598	KCNK3, KCNK15
46	GLSEVLVQI	57553	MICAL3
47	TLAEVRAVQEI	56950	SMYD2
48	VVASNIMEV	5209	PFKFB3
49	VLIVEVPGV	111	ADCY5
50	SLSDHIVLL	3675	ITGA3
51	NLWPMILTL	3675	ITGA3
52	SILDAVQRV	137902	PXDNL
53	FLLEIRQTL	23161	SNX13
54	ALVAKGLVQA	10327	AKR1A1
55	YLALILPVL	9122	SLC16A4
56	ILMDFSNSM	3691	ITGB4
57	SLQKEILYL	55102	ATG2B
58	FLVDFEQSHL	1573	CYP2J2
59	SLKNNVSV	7045	TGFBI
60	ILWKDIEYV	143425	SYT9
61	SLMGILLRI	22900	CARD8
62	VLGPAFLVQL	55244	SLC47A1
63	GLIEDHFDVTV	51752	ERAP1
64	LLAASVALA	4885	NPTX2
65	IYGGSVTGA	7167, 729708	TPI1, TPI1P1
66	TLLKTIKV	57545	CC2D2A
67	LLDVLAPLV	80781	COL18A1
68	YVLTQPPSV	28796, 28815, 28831, 3537, 3538	IGLV3-21, IGLV2-14, IGLJ3, IGLC1, IGLC2
69	ILADLLPSL	25979	DHRS7B
70	SLTALRLLL	9920	KBTBD11
71	ALDGHLYAV	9920	KBTBD11
72	YSLEKVFGI	10916	MAGED2
73	GLDGIPFTV	7205	TRIP6

Таблиця 1

Пептиди за цим винаходом

SEQ ID No	Послідовність	Ід. номер(и) гена(ів)	Символ(и) гена(ів)
74	GLFHKQVTV	23037	PDZD2
75	FLIKSINLV	143879	KBTBD3
76	VLADDHLIEV	100034743, 5174, 728939	PDZK1P2, PDZK1, PDZK1P1
77	SLIKHKIML	523	ATP6V1A
78	ALLDTVVQA	8911, 8912	CACNA1I, CACNA1H
79	ALADIVWRA	84182	FAM188B
80	KLASMLETL	112464	PRKCDBP
81	SLLPALPKL	4036	LRP2
82	SLLQATDFMSL	7070	THY1
83	IQWSIVPEV	23151	GRAMD4
84	YLMDEGAHL	7358	UGDH
85	FVMSEIRTV	114991	ZNF618
86	GLLQGLLALL	4835	NQO2
87	LADGVQKV	8542	APOL1
88	TLAELHISL	84166	NLRC5
89	SLLLAVTEV	3714	JAG2
90	FTLEKNFVI	1292	COL6A2
91	MLLSSLVSL	79001	VKORC1
92	FLFRDILEL	29102	DROSHA

Таблиця 2

Додаткові пептиди за цим винаходом,
щодо яких зв'язок з раковими захворюваннями не був встановлений

SEQ ID No	Послідовність	Ід. номер(и) гена(ів)	Символ(и) гена(ів)
93	GVMAGDIYSV	123	PLIN2
94	ILHHKVYDL	1528	CYB5A
95	KLTDVGIATL	115701	ALPK2
96	TLAETLVNL	283372, 283373	ANKRD52
97	TLISELVQA	9820	CUL7
98	KIPPVSPSI	57561	ARRDC3
99	GLAPHLEQI	79711	IPO4
100	KLNVAPLAV	653784, 80097	MZT2A, MZT2B
101	HIYDKAFITV	2321	FLT1
102	LLFDVHTTL	65250	C5orf42
103	KLQDGLLHI	7076	TIMP1
104	ALFEGVVRQI	6236	RRAD
105	ALADLDELLIRA	3339	HSPG2
106	VLMDLKALL	51428	DDX41

Таблиця 2

Додаткові пептиди за цим винаходом,
щодо яких зв'язок з раковими захворюваннями не був встановлений

SEQ ID No	Послідовність	Ід. номер(и) гена(ів)	Символ(и) гена(ів)
107	VLMDLKALLL	51428	DDX41
108	VLISVLQAI	26999	CYFIP2
109	YLWSRVEKL	120892	LRRK2
110	LLDLHSYLL	10299	MARCH6
111	TLLETEMLL	80817	CEP44
112	LLFDHLEPIEL	25780	RASGRP3
113	SLFDWNVKL	134111	UBE2QL1
114	ALAVNISAA	908	CCT6A

Таблиця 3

Пептиди, які доцільно використовувати, наприклад, для персоналізованої терапії раку

SEQ ID No	Послідовність	Ід. номер(и) гена(ів)	Символ(и) гена(ів)
115	LLDPKTIFL	26762	HAVCR1
116	GLVDIMVHL	8701	DNAH11
117	VLFGELPAL	8701	DNAH11
118	FLNAIETAL	8701	DNAH11
119	RLHDENILL	23322	RPGRIP1L
120	GLAGDNIYL	6582	SLC22A2
121	ALLRTVVSV	2590	GALNT2
122	SLDPSSPQV	9514	GAL3ST1
123	YVDPVITSI	4233	MET
124	ILSPLSVAL	5345	SERPINF2
125	KLDPTKTTL	10397	NDRG1
126	KIQEILTQV	10643	IGF2BP3
127	VLAPLFVYL	2535, 8321, 8324	FZD2, FZD1, FZD7
128	YLEEDVYQL	23255	SOGA2
129	VLAPRVLRA	5954	RCN1
130	ALPTVLVGV	5351	PLOD1
131	VMAGDIYSV	123	PLIN2
132	SVASTITGV	123	PLIN2
133	QLIDYERQL	11072	DUSP14
134	VADKIHSV	11072	DUSP14
135	VVDEGPTGV	9123	SLC16A3
136	YQDPHSTAV	1956	EGFR
137	TLVAIVGV	60681	FKBP10
138	SLDTLMTYV	22829	NLGN4Y
139	ILNVDGLIGV	47	ACLY
140	SLANNVTSV	131566	DCBLD2

Таблиця 3

Пептиди, які доцільно використовувати, наприклад, для персоналізованої терапії раку

SEQ ID No	Послідовність	Ід. номер(и) гена(ів)	Символ(и) гена(ів)
141	LLVDDSFHHTV	253982	ASPHD1
142	SVDVSPPKV	113146	AHNAK2
143	ALFVRLLALA	7045	TGFBI
144	RLLDVLAPLV	80781	COL18A1
145	SLHFLILYV	487, 488	ATP2A1, ATP2A2
146	KLIDLSQVMYL	346389	MACC1
147	ALADKELLPSV	84883	AIFM2
148	KLLTEVHAA	101	ADAM8
149	SILTIEDGIFEV	100287551, 3306, 3312	HSPA8P8, HSPA2, HSPA8
150	TLMPNINKL	5169	ENPP3
151	YMYEGPAPRI	5169	ENPP3

Цей винахід також загалом стосується пептидів за цим винаходом для застосування для лікування проліферативних захворювань, таких як, наприклад, рак легенів, рак нирки, рак головного мозку, рак шлунка, рак товстої або прямої кишки, рак печінки, рак підшлункової залози, рак передміхурової залози, лейкоз, рак молочної залози, меланома, рак яєчника і рак стравоходу.

Особливо переважними є пептиди - для застосування самостійно або в комбінації - за цим винаходом, вибрані з групи послідовностей від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 114. Особливо переважними є пептиди – для застосування самостійно або в комбінації - за цим винаходом, вибрані з групи послідовностей від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 63 (див. Таблицю 1) і їх застосування в імунотерапії НКК, раку легенів, раку головного мозку, раку шлунка, раку товстої або прямої кишки, раку печінки, раку підшлункової залози, раку передміхурової залози, лейкозу, раку молочної залози, меланоми, раку яєчника і раку стравоходу, і переважно НКК.

Як наведено далі у Таблиці 4А, багато пептидів за цим винаходом також виявлені на пухлинах інших видів і можуть, таким чином, також застосовуватися в імунотерапії за іншими показаннями. Див. також Фігуру 1Е і Приклад 1.

Таблиця 4А. Пептиди за цим винаходом та їх конкретне застосування при лікуванні інших проліферативних захворювань, особливо інших ракових захворювань. Із таблиці видно, на яких додаткових видах пухлин вибрані пептиди були виявлені і демонструють або надмірну презентацію на більш ніж 5 % досліджених зразків пухлин, або презентацію на більш ніж 5 % досліджених зразків пухлин зі співвідношенням середніх геометричних показників для пухлин і для нормальних тканин більшим ніж 3. Надмірна презентація визначається як більш висока презентація на зразку пухлини у порівнянні із зразком нормальної тканини з найвищим рівнем презентації.

SEQ ID No	Послідовність	Інші відповідні органи/захворювання
1	ALIVSLPYL	Печінка
2	ILWREVVTI	Яєчник
5	YLYPNLTRL	Печінка
8	GLASFKSFL	Підшлункова залоза
12	ALDPSGNQLI	Яєчник
14	ALLTETIFL	Лейкоцити
15	ILIKHLVKV	Печінка
16	FMPEELPQL	Підшлункова залоза, молочно залоза, яєчник
21	RLIQGDQILSV	Легеня, товста кишка, пряма кишка, печінка, яєчник
23	YIQEVVQYI	Печінка

SEQ ID No	Послідовність	Інші відповідні органи/захворювання
24	FTLGTTVFL	Печінка, передміхурова залоза, лейкоцити, стравохід
26	SLMEILYTL	Товста кишка, пряма кишка, підшлункова залоза, передміхурова залоза, яєчник
27	SLSDLLVSL	Легеня, печінка, підшлункова залоза, лейкоцити
28	FIADLVVGL	Меланома
29	ILLDLEQAL	Легеня, підшлункова залоза, передміхурова залоза, молочна залоза, яєчник
30	QLFYTKIFL	Легеня, товста кишка, пряма кишка, яєчник
31	VLFGLDPAVIKV	Головний мозок, яєчник
32	FLAGGIRGSGA	Шлунок
33	FIADVVEKI	Легеня, лейкоцити, яєчник
34	ELNNQNFYL	Меланома, стравохід
36	SLFGKKYIL	Товста кишка, пряма кишка
37	VLAPVILML	Легеня, товста кишка, пряма кишка, підшлункова залоза, яєчник
38	VLLDTILQL	Головний мозок, печінка, підшлункова залоза, меланома, яєчник
39	YLLNLNHLGL	Легеня, печінка, лейкоцити
44	ALFSFVTAL	Легеня, меланома, яєчник
45	ALLGIPLTL	Передміхурова залоза, яєчник, стравохід
46	GLSEVLVQI	Товста кишка, пряма кишка
47	TLAEVRAVQEI	Печінка, меланома
49	VLIVEVPGV	Яєчник
50	SLSDHIVLL	Легеня
51	NLWPMILTL	Легеня, підшлункова залоза, стравохід
52	SILDAVQRV	Легеня, головний мозок, підшлункова залоза, яєчник
54	ALVAKGLVQA	Меланома, яєчник
55	YLALILPVL	Меланома
56	ILMDFSNSM	Підшлункова залоза
59	SLKNNVVS	Підшлункова залоза, яєчник, стравохід
61	SLMGILLRI	Лейкоцити
63	GLIEDHFDVTV	Легеня, товста кишка, пряма кишка, передміхурова залоза, лейкоцити, меланома, яєчник
65	IYGGSVTGA	Молочна залоза
66	TLLKTIKV	Головний мозок
67	LLDVLAPLV	Легеня, шлунок, печінка, підшлункова залоза, молочна залоза, стравохід
68	YVLTQPPSV	Легеня, підшлункова залоза, лейкоцити, стравохід
69	ILADLLPSL	Легеня, головний мозок, підшлункова залоза, молочна залоза, яєчник
72	YSLEKVFGI	Печінка
73	GLDGIPFTV	Головний мозок, підшлункова залоза, молочна залоза, меланома
78	ALLDTVVQA	Печінка, передміхурова залоза
79	ALADIVWRA	Легеня, головний мозок, товста кишка, пряма кишка, печінка, підшлункова залоза, передміхурова залоза, яєчник, стравохід

SEQ ID No	Послідовність	Інші відповідні органи/захворювання
82	SLLQATDFMSL	Товста кишка, пряма кишка, підшлункова залоза, стравохід
84	YLMDEGAHL	Печінка
85	FVMSEIRTV	Печінка
86	GLLQGKLALL	Печінка, меланома
87	LADGVQKV	Молочна залоза, меланома
88	TLAELHISL	Яєчник
90	FTLEKNFVI	Передміхурова залоза
91	MLLSSLVSL	Легені, печінка
93	GVMAGDIYSV	Легеня, товста кишка, пряма кишка, печінка, стравохід
94	ILHHKVYDL	Печінка
96	TLAETLVNL	Легеня, шлунок, товста кишка, пряма кишка, підшлункова залоза, передміхурова залоза, молочна залоза, яєчник, стравохід
97	TLISELVQA	Легеня, товста кишка, пряма кишка, підшлункова залоза, передміхурова залоза, молочна залоза, меланома, яєчник, стравохід
98	KIPPVSPSI	Легеня, печінка, молочна залоза
99	GLAPHLEQI	Печінка, яєчник
100	KLNVAPLAV	Легеня, головний мозок, товста кишка, пряма кишка, печінка, підшлункова залоза, меланома, яєчник
101	HIYDKAFITV	Печінка, яєчник
102	LLFDVHTTL	Легеня, головний мозок
103	KLQDGLLHI	Головний мозок, товста кишка, пряма кишка, печінка
104	ALFEGVVRQI	Печінка, меланома, стравохід
105	ALADLDELLIRA	Підшлункова залоза, меланома
107	VLMDLKALLL	Передміхурова залоза, лейкоцити, яєчник
108	VLISVLQAI	Лейкоцити
109	YLWSRVEKL	Підшлункова залоза, яєчник
110	LLDLHSYLL	Шлунок, лейкоцити
111	TLLETEMLL	Підшлункова залоза, молочна залоза
112	LLFDHLEPIEL	Лейкоцити
113	SLFDWNVKL	Печінка, передміхурова залоза
114	ALAVNISAA	Легеня, головний мозок, печінка, підшлункова залоза, стравохід
115	LLDPKTIFL	Товста кишка, пряма кишка, печінка
116	GLVDIMVHL	Яєчник
117	VLFGELPAL	Легеня, підшлункова залоза, молочна залоза, яєчник
119	RLHDENILL	Легеня, головний мозок, товста кишка, пряма кишка, печінка, підшлункова залоза, передміхурова залоза, яєчник, стравохід
121	ALLRTVVSV	Легеня, печінка, підшлункова залоза, молочна залоза, яєчник
122	SLDPSSPQV	Печінка
123	YVDPVITSI	Легеня
124	ILSPLSVAL	Печінка, підшлункова залоза

SEQ ID No	Послідовність	Інші відповідні органи/захворювання
125	KLDPTKTTL	Передміхурова залоза
126	KIQEILTQV	Легеня, головний мозок, шлунок, товста кишка, пряма кишка, печінка, підшлункова залоза, лейкоцити, яєчник, стравохід
127	VLAPLFVYL	Легеня, підшлункова залоза, молочна залоза, меланома
128	YLEEDVYQL	Легеня, підшлункова залоза
129	VLAPRVLRA	Легеня, головний мозок, товста кишка, пряма кишка, печінка, підшлункова залоза, яєчник
130	ALPTVLVGV	Легеня, головний мозок, шлунок, товста кишка, пряма кишка, печінка, меланома, стравохід
131	VMAGDIYSV	Легеня, печінка, підшлункова залоза, стравохід
132	SVASTITGV	Печінка, молочна залоза
133	QLIDYERQL	Легеня, товста кишка, пряма кишка, печінка, підшлункова залоза, стравохід
134	VADKIHSV	Шлунок, підшлункова залоза, стравохід
135	VVDEGPTGV	Легеня, головний мозок, шлунок, печінка, підшлункова залоза, лейкоцити, молочна залоза, яєчник, стравохід
136	YQDPHSTAV	Головний мозок, печінка
137	TLVAIVVGV	Легеня, головний мозок, шлунок, товста кишка, пряма кишка, печінка, підшлункова залоза, передміхурова залоза, молочна залоза, яєчник
138	SLDTLMTYV	Легеня, головний мозок, товста кишка, пряма кишка, підшлункова залоза, передміхурова залоза, лейкоцити, стравохід
139	ILNVDGLIGV	Головний мозок, товста кишка, пряма кишка, печінка, передміхурова залоза
140	SLANNVTSV	Легеня, головний мозок, підшлункова залоза, меланома, яєчник, стравохід
141	LLVDDSFLLHTV	Головний мозок, печінка, підшлункова залоза, меланома, яєчник, стравохід
142	SVDVSPPKV	Легеня, підшлункова залоза, меланома, стравохід
143	ALFVRLLALA	Легеня, головний мозок, шлунок, товста кишка, пряма кишка, печінка, меланома, стравохід
144	RLLDVLAPLV	Печінка
145	SLHFLILYV	Легеня, головний мозок, товста кишка, пряма кишка, печінка, меланома, яєчник
146	KLIDLSQVMYL	Легеня, товста кишка, пряма кишка, підшлункова залоза, яєчник
147	ALADKELLPSV	Легеня, товста кишка, пряма кишка, печінка, підшлункова залоза, меланома, яєчник
148	KLLTEVHAA	Легеня, шлунок, товста кишка, пряма кишка, печінка, молочна залоза, яєчник, стравохід
149	SILTIEDGIFEV	Легеня, головний мозок, товста кишка, пряма кишка, печінка, підшлункова залоза, передміхурова залоза, лейкоцити, молочна залоза, меланома, яєчник
150	TLMPNINKL	Печінка

Таблиця 4Б. Пептиди за цим винаходом та їх конкретне застосування при лікуванні інших проліферативних захворювань, особливо інших ракових захворювань. Із таблиці видно, як і з Таблиці 4А, на яких додаткових видах пухлин були виявлені вибрані пептиди, що демонструють надмірну презентацію (включаючи специфічну презентацію) на більш ніж 5 % досліджених зразків пухлин, або презентацію на більш ніж 5 % досліджених зразків пухлин зі співвідношенням середніх геометричних показників для пухлин і для нормальних тканин більшим ніж 3. Надмірна презентація визначається як більш висока презентація на зразку пухлини у порівнянні із зразком нормальної тканини з найвищим рівнем презентації. Нормальними тканинами, у порівнянні з якими була досліджена надмірна презентація, були: жирова тканина, надниркова залоза, клітини крові, кровоносні судини, кістковий мозок, головний мозок, хрящ, стравохід, око, жовчний міхур, серце, нирки, товста кишка, печінка, легені, лімфатичний вузол, нервова тканина, підшлункова залоза, паращитоподібна залоза, очеревина, гіпофіз, плевра, слинна залоза, скелетні м'язи, шкіра, тонка кишка, селезінка, шлунок, тимус, щитоподібна залоза, трахея, сечовід, сечовий міхур.

SEQ ID No	Послідовність	Додаткові види пухлин
2	ILWREVVT	Меланома, НХЛ
4	FLSQDIITV	Рак матки
6	VLFELSKTV	ГМЛ
8	GLASFKSFL	Меланома, рак сечового міхура, рак матки, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків
10	KLLQNNYGL	РМЗ, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків
12	ALDPSGNQLI	Рак головного мозку
13	KIMAQILTV	ХЛЛ, НХЛ
14	ALLTETIFL	НХЛ
15	ILIKHLVKV	Рак матки, НХЛ
17	ILAQQVHAL	Рак матки
18	YVLDLAAKV	ДРЛ, ХЛЛ, РМЗ, меланома, рак матки, НХЛ
20	AVANTTFTV	Рак стравоходу, рак сечового міхура, рак матки
21	RLIQGDQILSV	ДРЛ, РМЗ, рак стравоходу, рак сечового міхура, рак матки, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків, РЯ
24	FTLGTTVFL	Меланома, рак матки, НХЛ
26	SLMEILYTL	Меланома, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків, ГМЛ, РЯ, ДРЛ
27	SLSDLLVSL	КРК, меланома, рак матки, ГМЛ, НХЛ
28	FIADLVVGL	ДРЛ, ХЛЛ, ГМЛ, НХЛ
29	ILLDLEQAL	Меланома, рак сечового міхура, рак матки, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків, ГМЛ, НХЛ, РЯ
30	QLFYTKIFL	Меланома, рак стравоходу, рак сечового міхура, рак матки, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків
33	FIADVVEKI	ДРЛ, РМЗ, рак стравоходу
34	ELNNQNFYL	КРК, рак сечового міхура, ГМЛ, НХЛ
36	SLFGKKYIL	Рак сечового міхура, рак матки, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків
38	VLLDTILQL	НДРЛ, ДРЛ, ХЛЛ, РМЗ, рак стравоходу, рак сечового міхура, рак матки, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків, ГМЛ, НХЛ, РЯ
39	YLLNLNHLGL	НХЛ
40	YIQEHLLQI	Меланома
43	YLKDELDEL	Рак стравоходу, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків, НХЛ
45	ALLGIPLTL	РМЗ, меланома, рак сечового міхура, рак матки, РЯ

46	GLSEVLVQI	ДРЛ, ГЦК, меланома, рак сечового міхура, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків, НХЛ
48	VVASNIMEV	РМЗ, меланома
49	VLIVEVPGV	Рак жовчного міхура, рак жовчних протоків, РЯ
50	SLSDHIVLL	РПШЗ, меланома, рак стравоходу, рак сечового міхура, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків
51	NLWPMILT	Меланома, рак матки, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків, рак стравоходу
52	SILDAVQRV	ДРЛ, РМЗ, меланома, рак матки
54	ALVAKGLVQA	НХЛ
55	YLALILPVL	ХЛЛ
56	ILMDFSNSM	Рак сечового міхура, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків
57	SLQKEILYL	Меланома
59	SLKNNVSV	Меланома, рак матки, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків
61	SLMGILLRI	РМЗ
62	VLAGPAFLVQL	Рак матки
63	GLIEDHFDVTV	ДРЛ
64	LLAASVALA	Рак головного мозку, ГМЛ
65	IYGGSVTGA	ХЛЛ, меланома, рак жовчного міхура, рак матки
66	TLLKTIKV	Меланома, рак сечового міхура
67	LLDVLAPLV	КРК, меланома, рак сечового міхура, рак матки, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків
68	YVLTQPPSV	РМЗ
69	ILADLLPSL	ДРЛ, меланома, рак стравоходу, рак матки, ГМЛ, НХЛ
72	YSLEKVFGI	Рак головного мозку, РШ, КРК, РПМЗ, РМЗ, меланома, РЯ, рак сечового міхура, ГМЛ, РПШЗ
73	GLDGIPFTV	РШ, Рак сечового міхура, рак матки, ГМЛ
75	FLIKSINLV	ХЛЛ, меланома, ГМЛ
76	VLADDHLIEV	ГЦК, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків
77	SLIKHKIML	КРК, меланома, рак матки
78	ALLDTVVQA	РМЗ
79	ALADIVWRA	ДРЛ, РМЗ, рак сечового міхура, рак матки, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків, рак стравоходу, РЯ
80	KLASMLETL	Меланома
81	SLLPALPKL	РМЗ
82	SLLQATDFMSL	НДРЛ, рак головного мозку, РМЗ, меланома, рак матки, НХЛ, РПШЗ
83	IQWSIVPEV	ХЛЛ, меланома, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків, ГМЛ, НХЛ
84	YLMDEGAHL	Рак жовчного міхура, рак жовчних протоків
85	FVMSEIRTV	Рак матки, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків
86	GLLQGKLALL	Рак матки, НХЛ
88	TLAELHISL	ХЛЛ, рак стравоходу
89	SLLLAVTEV	ДРЛ, РМЗ, меланома, рак сечового міхура
90	FTLEKNFVI	КРК, РМЗ, РПШЗ
91	MLLSSLVSL	ДРЛ, меланома, рак сечового міхура, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків
92	FLFRDILEL	Меланома, ГМЛ

93	GVMAGDIYSV	Рак жовчного міхура, рак жовчних протоків, РПШЗ
95	KLTDVGIATL	Меланома, НХЛ
96	TLAETLVNL	ДРЛ, ГЦК, ХЛЛ, меланома, рак сечового міхура, рак матки, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків, ГМЛ, НХЛ
97	TLISELVQA	ДРЛ, РШ, ГЦК, ХЛЛ, рак сечового міхура, рак матки, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків, НХЛ
98	KIPPVSPSI	Рак матки, НХЛ
99	GLAPHLEQI	РМЗ, меланома, ГМЛ, НХЛ
100	KLNVAPLAV	ХЛЛ, РМЗ, рак матки, ГМЛ, НХЛ, РЯ
101	HIYDKAFITV	ДРЛ, РМЗ
102	LLFDVHTTL	ДРЛ, меланома, рак сечового міхура, рак матки, ГМЛ
103	KLQDGLLHI	ДРЛ, РПШЗ, меланома, РЯ, НХЛ
104	ALFEGVVRQI	Рак сечового міхура
105	ALADLDELLIRA	РМЗ
106	VLMDLKALL	ГМЛ
107	VLMDLKALLL	ГМЛ
108	VLISVLQAI	РМЗ, ГМЛ, НХЛ
109	YLWSRVEKL	ХЛЛ, НХЛ
110	LLDLHSYLL	Рак матки
111	TLLETEMLL	Рак сечового міхура
112	LLFDHLEPIEL	РМЗ, НХЛ
113	SLFDWNVKL	ДРЛ, РМЗ, рак стравоходу, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків, ГМЛ, НХЛ
114	ALAVNISAA	РШ, КРК, ХЛЛ, РМЗ, меланома, рак сечового міхура, рак матки, рак жовчного міхура, рак жовчних протоків, ГМЛ, НХЛ, РПШЗ

НДРЛ - недрібноклітинний рак легенів, ДРЛ - дрібноклітинний рак легенів, РН - рак нирки, РТПК - рак товстої і прямої кишки, РШ - рак шлунка, ГЦК - рак печінки, РПШЗ - рак підшлункової залози, РПМЗ - рак передміхурової залози, РМЗ - рак молочної залози, ККМ - карцинома з клітин Меркеля, РЯ - рак яєчника, НХЛ - неходжкінська лімфома, ГМЛ - гострий мієлоїдний лейкоз, ХЛЛ - хронічний лімфоцитарний лейкоз.

Отже, у ще одному аспекті цей винахід стосується застосування принаймні одного пептиду за цим винаходом відповідно до будь-якої з SEQ ID No. 21, 27, 29, 30, 33, 37, 39, 44, 50, 51, 52, 63, 67, 68, 69, 79, 91, 93, 96, 97, 98, 100, 102, 114, 117, 119, 121, 123, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 165, 137, 138, 140, 142, 143, 145, 146, 147, 148 і 149 для – у одному переважному втіленні комбінованого – лікування раку легенів.

Отже, у ще одному аспекті цей винахід стосується застосування принаймні одного пептиду за цим винаходом відповідно до будь-якої з SEQ ID No 31, 38, 52, 66, 69, 73, 79, 100, 102, 103, 114, 119, 126, 129, 130, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 143, 145 і 149 для - у одному переважному втіленні комбінованого - лікування раку головного мозку.

Отже, у ще одному аспекті цей винахід стосується застосування принаймні одного пептиду за цим винаходом відповідно до будь-якої з Seq ID No 32, 67, 96, 110, 126, 130, 134, 135, 137, 143 і 148 для - у одному переважному втіленні комбінованого - лікування раку шлунка.

Отже, у ще одному аспекті цей винахід стосується застосування принаймні одного пептиду за цим винаходом відповідно до будь-якої з Seq ID No. 21, 26, 30, 36, 37, 46, 63, 79, 82, 93, 96, 97, 100, 103, 115, 119, 126, 129, 130, 133, 137, 138, 139, 143, 145, 146, 147, 148 і 149 для - у одному переважному втіленні комбінованого - лікування колоректального раку.

Отже, у ще одному аспекті цей винахід стосується застосування принаймні одного пептиду за цим винаходом відповідно до будь-якої з Seq ID No 1, 5, 15, 21, 23, 24, 27, 38, 39, 47, 67, 72, 78, 79, 84, 85, 86, 91, 93, 94, 98, 99, 100, 101, 103, 104, 113, 114, 115, 119, 121, 122, 124, 126, 129, 130, 131, 132, 133, 135, 136, 137, 139, 141, 143, 144, 145, 147, 148, 149 і 150 для - у одному переважному втіленні комбінованого - лікування раку печінки.

Отже, у ще одному аспекті цей винахід стосується застосування принаймні одного пептиду за цим винаходом відповідно до будь-якої з Seq ID No 8, 16, 26, 27, 29, 37, 38, 51, 52, 56, 59, 67, 68, 69, 73, 79, 82, 96, 97, 100, 105, 109, 111, 114, 117, 119, 121, 124, 126, 127, 128, 129, 131, 133, 134, 135, 137, 138, 140, 141, 142, 146, 147, 148 і 149 для - у одному переважному втіленні комбінованого - лікування раку підшлункової залози.

Отже, у ще одному аспекті цей винахід стосується застосування принаймні одного пептиду за цим винаходом відповідно до будь-якої з Seq ID No 24, 26, 29, 45, 63, 78, 79, 90, 96, 97, 107, 113, 119, 125, 137, 138, 139 і 149 для - у одному переважному втіленні комбінованого - лікування раку передміхурової залози.

Отже, у ще одному аспекті цей винахід стосується застосування принаймні одного пептиду за цим винаходом відповідно до будь-якої з Seq ID No 14, 24, 27, 33, 39, 61, 63, 68, 107, 108, 110, 112, 126, 135, 138 і 149 для - у одному переважному втіленні комбінованого - лікування лейкозу.

Отже, у ще одному аспекті цей винахід стосується застосування принаймні одного пептиду за цим винаходом відповідно до будь-якої з Seq ID No 16, 29, 65, 67, 69, 73, 87, 96, 97, 98, 111, 117, 121, 127, 132, 135, 137, 148 і 149 для - у одному переважному втіленні комбінованого - лікування раку молочної залози.

Отже, у ще одному аспекті цей винахід стосується застосування принаймні одного пептиду за цим винаходом відповідно до будь-якої з Seq ID No 28, 34, 38, 44, 47, 54, 55, 63, 73, 86, 87, 97, 100, 104, 105, 127, 130, 140, 141, 142, 143, 145, 147 і 149 для - у одному переважному втіленні комбінованого - лікування меланоми.

Отже, у ще одному аспекті цей винахід стосується застосування принаймні одного пептиду за цим винаходом відповідно до будь-якої з Seq ID No 2, 12, 16, 21, 26, 29, 30, 31, 33, 37, 38, 44, 45, 49, 52, 54, 59, 63, 69, 79, 88, 96, 97, 99, 100, 101, 107, 109, 116, 117, 119, 121, 126, 129, 135, 137, 140, 141, 145, 146, 147, 148 і 149 для - у одному переважному втіленні комбінованого - лікування раку яєчника.

Отже, у ще одному аспекті цей винахід стосується застосування принаймні одного пептиду за цим винаходом відповідно до будь-якої з Seq ID No 24, 34, 45, 51, 59, 67, 68, 79, 82, 93, 96, 97, 104, 114, 119, 126, 130, 131, 133, 134, 135, 138, 140, 141, 142, 143 і 148 для - у одному переважному втіленні комбінованого - лікування раку стравоходу.

Отже, у ще одному аспекті цей винахід стосується застосування пептидів за цим винаходом для - бажано комбінованого - лікування проліферативного захворювання, вибраного з групи НКК, раку легенів, раку головного мозку, раку шлунка, колоректального раку, раку печінки, раку підшлункової залози, раку передміхурової залози, лейкозу, раку молочної залози, меланоми, раку яєчника і раку стравоходу, і переважно НКК.

Переважно цей винахід стосується застосування пептидів за цим винаходом відповідно до SEQ ID NO: 1 і (або) 15 для - бажано комбінованого - лікування проліферативного захворювання, вибраного з групи НКК, раку легенів, раку головного мозку, раку шлунка, колоректального раку, раку печінки, раку підшлункової залози, раку передміхурової залози, лейкозу, раку молочної залози, меланоми, раку яєчника і раку стравоходу, і переважно НКК.

Цей винахід також стосується пептидів за цим винаходом, 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 винахід також стосується пептидів за цим винаходом, де згадані пептиди (кожний із них) складаються або по суті складаються з амінокислотної послідовності від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 114.

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

Цей винахід також стосується пептидів за цим винаходом, 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.

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

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

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

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

5 Цей винахід також стосується Т-клітинних рецепторів (ТКР), зокрема розчинних ТКР (рТКР), і клонованих ТКР, вбудованих у аутологічні або алогенні Т-клітини, та способів їх отримання, а також NK-клітин або інших клітин, що несуть згаданий ТКР або вступають у перехресну реакцію із згаданими ТКР.

Антитіла і ТКР є додатковими втіленнями імунотерапевтичного застосування пептидів відповідно до послідовностей від SEQ ID 1 до SEQ ID 151 за винаходом що розглядається.

10 Цей винахід також стосується клітини-хазяїна за цим винаходом, що містить нуклеїнову кислоту за цим винаходом або вектор експресії, як зазначено вище. Цей винахід також стосується клітини-хазяїна за цим винаходом, де антиген-презентуюча клітина є дендритною клітиною, і переважно дендритною клітиною.

15 Цей винахід також стосується способу отримання пептиду за цим винаходом, причому спосіб включає культивування клітини-хазяїна за цим винаходом і виділення пептиду зі згаданого клітини-хазяїна або її культурального середовища.

Цей винахід також стосується способу за цим винаходом, 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.

Цей винахід також стосується способу за цим винаходом, де антиген-презентуюча клітина містить вектор експресії, що здатний експресувати або експресує згаданий пептид, що містить послідовність від SEQ ID No. 1 до SEQ ID No.: 114, переважно, що містить послідовність від SEQ ID No. 1 до SEQ ID No.63 або варіант амінокислотної послідовності.

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

Цей винахід також стосується способу знищення клітин-мішеней в організмі пацієнта, клітини-мішені якого абераантно експресують поліпептид, що містить будь-яку амінокислотну послідовність за цим винаходом, причому спосіб включає введення в організм пацієнта ефективною кількістю Т-клітин за цим винаходом.

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

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

40 Цей винахід також стосується застосування за цим винаходом, де згадані ракові клітини є клітинами НКК, раку легенів, раку головного мозку, раку шлунка, раку товстої або прямої кишки, раку печінки, раку підшлункової залози, раку передміхурової залози, лейкозу, раку молочної залози, меланоми, раку яєчника і раку стравоходу, і переважно НКК.

Цей винахід також стосується біомаркерів на основі пептидів за цим винаходом, які у цьому документі іменуватимуться як "мішені", які можуть використовуватися в діагностиці раку, переважно НКК. Маркером може бути надмірна презентація самого(-их) пептиду(-ів) або надмірна експресія відповідного(-их) гена(-ів). Маркери також 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 забарвлення зрізів пухлини для виявлення присутності досліджуваного пептиду у комплексі з МНС.

Необов'язково, антитіло містить додаткову функціональну ділянку, таку як імуностимулюючий домен або токсин.

Цей винахід також стосується цих нових мішеней у контексті лікування раку.

55 АВССЗ асоціюється з гепатоцелюлярною карциномою, раком яєчника, раком прямої кишки, остеосаркомою, раком молочної залози, недрібноклітинним раком легенів, мультиформною гліобластомою і аденокарциномою протоків підшлункової залози (Mohelnikova-Duchonova et al., 2013; Molina-Pinelo et al., 2014; Goode et al., 2014; Liu et al., 2014c; Yu et al., 2014; Sedlakova et al., 2015; Zuniga-Garcia et al., 2015; Wang et al., 2014c).

ACLY абераантно експресується у багатьох пухлинах, таких як рак молочної залози, печінки, товстої кишки, легенів і передміхурової залози, і спостерігалася зворотня кореляція зі стадією розвитку пухлини і диференціацією (Zu et al., 2012).

Надмірна експресія ADAM8 при раку підшлункової залози асоціюється з підвищеною міграцією і інвазивністю клітин аденокарциноми протоків підшлункової залози (Schlomann et al., 2015). ADAM8 бере участь у міграції і інвазії пухлинних клітин при раку легенів, нирковоклітинній карциномі і раку головного мозку (Mochizuki and Okada, 2007).

Гіперметилування гена ADCY5 і знижена експресія iPHK відбувається при гострому лімфобластному лейкозі, хронічному лімфоцитарному лейкозі і аденокарциномі легенів (Kuang et al., 2008; Tong et al., 2010; Sato et al., 2013a).

HNNAK2 є важливим елементом неklasичного шляху секреції фактору-1 росту фібробластів (FGF1), елементу, що бере участь у рості і інвазії пухлини (Kirov et al., 2015).

Було показано, що експресія AIFM2 знижена у більшості пухлин людини (Wu et al., 2004; Mei et al., 2006). AIFM2 був ідентифікований як один із дев'яти генів, які асоціюються з функціональним пригніченням онкогенності у клітинних лініях раку яєчника (Notaridou et al., 2011).

Було показано, що активність AKR1A1 підвищена при раку молочної залози і асоціюється з раком легенів і раком гортані (Penning, 2014; Hlavac et al., 2014; Kim et al., 2012).

Експресія ALPK2 знижена у колоректальній аденомі і, можливо, відіграє роль у переході нормальної крипти товстої кишки у аденому (Yoshida et al., 2012). Для ALPK2 спостерігався тісний взаємозв'язок між втратою кількості копій і його низьким рівнем при раку шлунка (Junnla et al., 2010).

Було показано, що активність ANGPTL4 є підвищеною при раку молочної залози, серозному раку яєчника і асоціюється з гліобластомою, гепатоцелюлярною карциномою, пласкоклітинною карциномою порожнини рота і раком легенів (Ferguson et al., 2013; Tanaka et al., 2015; Ng et al., 2014; Garner et al., 2015; Schumann et al., 2015; Johnson et al., 2015).

Експресія APOL1 знижена у тканинах і лініях клітин нирковоклітинної карциноми (Hu et al., 2012).

ARRDC3 асоціюється з раком молочної залози і раком передміхурової залози (Wang et al., 2014a; Huang et al., 2012a).

Мутації зсуву рамки зчитування є типовими для ATG2B у карциномах шлунка і товстої кишки з високою мікросателітною нестабільністю (Kang et al., 2009).

Було показано, що активність ATP11A підвищена при колоректальному раку і асоціюється з лімфобластним лейкозом і пропонується використовувати це підвищення як біомаркер метастазів при колоректальному раку (Miyoshi et al., 2010; Zhang et al., 2005).

Було показано, що активність ATP2A1 підвищена при раковій кахексії (Fontes-Oliveira et al., 2013).

ATP2A2 асоціюється з раком шкіри, раком товстої кишки і раком легенів (Korosec et al., 2006; Hovnanian, 2007).

CACNA1H асоціюється з альдостерон-продукуючими аденомами, раком передміхурової залози і раком молочної залози (Felizola et al., 2014; Asaga et al., 2006; Gackiere et al., 2013).

CACNA1I асоціюється з раком товстої кишки, раком молочної залози і раком передміхурової залози (Basson et al., 2015).

CARD8 експресується на високому рівні у декількох лініях ракових клітин, включаючи рак яєчника, молочної залози і легенів, а також у тканинах, отриманих від пацієнтів з колоректальною карциномою, раком шлунка і раком молочної залози (Pathan et al., 2001; Yamamoto et al., 2005).

CST6A пов'язаний з герміногенними пухлинами яєчка і злоякісними меланомами (Tanic et al., 2006; Alagaratnam et al., 2011).

Активність CIT часто підвищена при гепатоцелюлярній карциномі (ГЦК) у порівнянні з прилеглими непухлинними тканинами. Нокдаун CIT в результаті PHK-інтерференції (RNAi) пригнічує онкогенність клітин ГЦК in vivo (Fu et al., 2011).

Знижений рівень експресії CLIC4 у пухлинних клітинах і підвищений у стромі пухлини є типовим для багатьох видів ракових захворювань людини, включаючи рак нирки, яєчника, молочної залози, легенів і шкіри і характеризує злоякісне прогресування (Suh et al., 2007a; Okudela et al., 2014; Suh et al., 2007b).

Повідомлялося про різну експресію COL18A1 для раку сечового міхура, пухлин, клітини яких мають паличкоподібні ядра, і карциноми яєчників, і, як було показано, специфічний поліморфізм у гені підвищує ризик розвитку спорадичного раку молочної залози (Fang et al., 2013; Gadd et al., 2010; Lourenco et al., 2006; Peters et al., 2005).

COL6A2 асоціюється з раком шийки матки, низькою загальною виживаністю у хворих на серозний рак яєчника високого ступеню злоякісності, В-лінійний гострий лімфобластний лейкоз, гепатоцелюлярну карциному, первинні і метастатичні пухлини головного мозку, пласкоклітинну карциному легенів, пласкоклітинну карциному голови та шиї і був описаний як потенційний інструмент аналізу метилювання ДНК при раку шийки матки (Cheon et al., 2014; Chen et al., 2014c; Vachani et al., 2007; Liu et al., 2010b; Seong et al., 2012; Hogan et al., 2011).

CUL7 іасоціюється з раком підшлункової залози і гепатоцелюлярною карциномою (Wang et al., 2014b; Paradis et al., 2013).

SERPINB4 експресується на низьких рівнях у гепатоцелюлярній карциномі (Khan et al., 2013a). CYB5A є прогностичним фактором для аденокарциноми протоків підшлункової залози, який виконує свою функцію супресора пухлин шляхом індукції аутофагії і модуляції TRAF6 (Giovannetti et al., 2014). CYB5A кодує фермент, який детоксифікує канцерогенні молекули і є прогностичним фактором для раку підшлункової залози (Blanke et al., 2014; Giovannetti et al., 2014).

Рівень експресії CYFIP2 підвищується у щойно утворених лімфовузлах при раку молочної залози (Gantsev et al., 2013). Експресія CYFIP2 знижена у зразках пухлин шлунка людини у порівнянні з контрольними тканинами (Cheng et al., 2013). CYFIP2 є одним із декількох генів, пов'язаних з апоптозом, метильованих при хронічному лімфоцитарному лейкозі (Halldorsdottir et al., 2012).

CYP2J2 є ферментом, який, як було показано, надмірно експресується у пухлинах багатьох видів раку людини, включаючи рак стравоходу, легенів, молочної залози, шлунка, печінки і товстої кишки. CYP2J2 підвищує проліферацію і інгібує апоптоз клітин карцином шляхом сприяння фосфорилуванню EGFR і активації сигнальних шляхів PI3K і MAPK з подальшим метаболізуюванням інгібіторів тирозинкіназ, у такий спосіб надаючи резистентність до протиракових засобів (Jiang et al., 2005; Narjoz et al., 2014).

Експресія DCBLD2 є підвищеною у гліобlastомах у ракових пухлинах голови та шиї (HNC), і він є необхідним для EGFR-стимульованого пухлиногенезу (Feng et al., 2014). Крім того, експресія DCBLD2 є підвищеною у сублінях клітин і зразках тканин раку легенів із високим метастатичним потенціалом (Koshikawa et al., 2002). Навпаки, експресія DCBLD2 пригнічується шляхом гіперметилювання його промотору при раку шлунка (Kim et al., 2008).

DDX41 асоціюється з гострим мієлоїдним лейкозом (Antony-Debre and Steidl, 2015).

DROSHA, один із двох найважливіших ферментів синтезу мікроРНК, надмірно експресується клітинами декількох видів раку, включаючи пухлини шлунково-кишкового тракту, рак молочної залози і рак шийки матки, і, очевидно, прискорює проліферацію, утворення колоній і міграцію пухлинних клітин (Avery-Kiejda et al., 2014; Havens et al., 2014; Zhou et al., 2013).

Однонуклеотидні поліморфізми у гені DUSP14 мають зв'язок із зміною ризику розвитку меланоми (Yang et al., 2014a; Liu et al., 2013).

Було показано, що активність EGFR підвищена при раку молочної залози і аденоїдній карциномі слинної залози і асоціюється з недрібноклітинним раком легенів, гепатоцелюлярною карциномою і колоректальним раком (Dienstmann et al., 2015; Wang et al., 2015b; Steinway et al., 2015; Xiao et al., 2015; Inoue et al., 2015).

Було показано, що експресія EGLN3 підвищена при недрібноклітинному раку легенів і нирково-клітинних карциномах. Більш того, існує зв'язок між EGLN3 і світлоклітинною нирково-клітинною карциномою і колоректальним раком (Tanaka et al., 2014; Yang et al., 2014d; Toth et al., 2014; Chu et al., 2014).

Було показано, що експресія ENO1 підвищена при недрібноклітинному раку легенів. Крім цього, ENO1 асоціюється з карциномою ендометрію, аденокарциномою протоків підшлункової залози, гліобlastомою і назофарингеальною карциномою (Yang et al., 2014b; Naryzhnyi et al., 2014; Principe et al., 2015; Fu et al., 2015; Zhao et al., 2015a).

ENO2 асоціюється з раком легенів, солідною нейроендокринною карциномою, зернисто-клітинними пухлинами і раком підшлункової залози (Sigari et al., 2014; Zizi-Sermpetzoglou et al., 2014; Liu et al., 2014a; Bedir et al., 2015; Wang et al., 2013b).

ENO3 асоціюється з лімфомою В-клітин, альвеолярною саркомою м'яких тканин, рабдоміосаркомою і нейробластомою (Oka et al., 1989; Mukai et al., 1986; Royds et al., 1985; Ishiguro et al., 1984).

ENPP3 асоціюється з нейробластомою, колоректальним раком стадії II, пласкоклітинною карциномою голови та шиї, гострим базофільним лейкозом і карциномою жовчних протоків (Agesen et al., 2012; Staal-Viliare et al., 2007; Gomez-Villafuertes et al., 2014; Yano et al., 2004; Thiel et al., 2011).

Існує зв'язок між ERAP1 і карциною шийки матки, нирково-клітинною карциною, пласкоклітинною карциною стравоходу, меланою, карциною яєчника і нейробластомою (Mehta et al., 2015; Forloni et al., 2010; Liu et al., 2010a; Kamphausen et al., 2010; Ayshamgul et al., 2011; Stoehr et al., 2013).

5 Було показано, що рівень експресії ESM1 підвищений при раку шлунка і що він асоціюється з гепатобластомою, назофарингеальною карциною і раком яєчника і може бути потенційним біомаркером раку шлунка (Yu et al., 2013; Dong et al., 2014; Lv et al., 2014; El Behery et al., 2013).

Було показано, що активність FHL2 підвищена при гострому мієлоїдному лейкозі, раку яєчника, раку легенів, карциномі товстої кишки, раку молочної залози, аденокарциномі протоків підшлункової залози і злоякісній меланомі людини і її активність знижена при раку передміхурової залози і рабдоміосаркомі (Kleiber et al., 2007; Westphal et al., 2015; Qian et al., 2010; Zienert et al., 2015).

FKBP10 був ідентифікований як новий ген, який бере участь у набутті лейкозними клітинами адриаміцин-резистентного фенотипу і його підтримці (Sun et al., 2014b). FKBP10 асоціювався з колоректальним раком через його підвищену експресію (Olesen et al., 2005). Навпаки, недостатня експресія FKBP10 була характерною для епітеліальних карцином яєчника (Quinn et al., 2013).

Існує зв'язок між FLT1 і раком товстої кишки, раком передміхурової залози, недрібноклітинним раком легенів і раком підшлункової залози (Awasthi et al., 2015; Heist et al., 2015; Tsourlakis et al., 2015; Zhang et al., 2015).

FZD1 асоціюється з раком стравоходу, карциною щитоподібної залози, саркомою матки, раком передміхурової залози, пласкоклітинною/аденоскваматозною карциною і аденокарциною жовчного міхура, раком товстої кишки і раком молочної залози (Goksel et al., 2014; Hung et al., 2014; Davidov et al., 2014; Su et al., 2015; Zhang et al., 2012a; Planutis et al., 2013; Devaney et al., 2013; Li et al., 2014a).

Було показано, що активність FZD2 підвищена при раку стравоходу і асоціюється з пухлиною строми шлунково-кишкового тракту, аденокістозною карциною слинних залоз і колоректальним раком (Wang and Zheng, 2014; Ding et al., 2015; Prakash et al., 2005; Liu et al., 2014b).

30 Було показано, що активність FZD7 підвищена при раку яєчника і асоціюється з раком шийки матки, гепатоцелюлярною карциною, колоректальним раком, меланою, раком молочної залози, раком шлунка і центральною нейроцитомою (Anastas et al., 2014; Li et al., 2014c; Gonzalez et al., 2014; Song et al., 2014; Deng et al., 2015; Asad et al., 2014; Vasiljevic et al., 2013; Rocken and Warneke, 2012; Dey et al., 2013).

35 Активність GAL3ST1 підвищена у тканинах нирково-клітинної карциноми (НKK) і у лінії SMKT-R3 клітин НKK (Honke et al., 1996). GAL3ST1 експресується у високих кількостях у клітинах карциноми епітелію яєчника у порівнянні з нормальними тканинами строми яєчника і нормальним клітинами поверхневого шару епітелію яєчника (Liu et al., 2010c).

40 Було показано, що GALNT2, N-ацетилгалактозамінілтрансфераза 2, проявляє антипроліферативну і антиметастатичну активність шляхом зменшення рівнів MMP-2 і TGF-бета1 у клітинах раку шлунка і шляхом інгібування активності EGF-рецептора у гепатоцелюлярній карциномі, де його експресія часто знижена. У протилежність цьому, у пласкоклітинній карциномі, як повідомлялося, надмірна експресія GALNT2 підвищує інвазивний потенціал пухлинних клітин шляхом модифікації O-глікозилювання і активності EGFR (Hua et al., 2012; Lin et al., 2014; Wu et al., 2011).

GRAMD4 експресується у високих кількостях у лініях клітин гепатоцелюлярної карциноми (ГЦК) і тканинах ГЦК, і його підвищена експресія корелює з клініко-патологічними характеристиками ГЦК (Zhang et al., 2013).

45 HAVCR1 був охарактеризований як новий кандидат у біомаркери, що асоціюється зі світлоклітинним раком яєчника і нирковоклітинною карциною (Bonventre, 2014; Kobayashi et al., 2015). Стало відомо, що HAVCR1 активує вісь IL-6/STAT-3/HIF-1A у лінії клітин, отриманих із світлоклітинної нирково-клітинної карциноми, і визначає прогресію пухлини і клінічний результат у пацієнтів (Cuadros et al., 2014). Конститутивна експресія HAVCR1 у нирці була охарактеризована як ознака потенційної схильності до розвитку світлоклітинної нирково-клітинної карциноми (Cuadros et al., 2013). Було описано підвищену активність HAVCR1 у світлоклітинних нирково-клітинній карциномі і карциномі яєчника і пухлинах колоректального раку (Wang et al., 2013c). Підвищену активність HAVCR1 було описано як потенційний діагностичний біомаркер колоректального раку і прогностичний маркер довшого періоду без ознак захворювання після хірургічної операції, який, можливо, також залучений у метастатичний

каскад при колоректальному раку (Wang et al., 2013c). Було показано, що HAVCR1 асоціюється з Т-клітинним лейкозом із великих гранулярних лейкоцитів (Wlodarski et al., 2008).

HSF2BP кодує HSF2-зв'язувальний білок, який пов'язаний із HSF2 і може бути залученим у модуляцію активації HSF2 (RefSeq, 2002).

5 HSF4 кодує фактор транскрипції теплового шоку 4, який активує гени відповіді на тепловий шок за умов теплового або іншого стресу (RefSeq, 2002). Було показано, що HSF4 має знижену активність у гліобластомі (Mustafa et al., 2010).

Результати різних досліджень надають можливість припустити важливу роль HSPA2 у прогресування хвороби на рак шийки матки, нирково-клітинну карциному і рак сечового міхура. Поліморфізм гену зв'язаний з розвитком раку шлунка (Ferrer-Ferrer et al., 2013; Garg et al., 2010a; Garg et al., 2010b; Singh and Suri, 2014).

10 Було показано, що HSPA8 надмірно експресується у пласкоклітинній карциномі стравоходу і що високі рівні HSPA8 у клітинах раку стравоходу *in vitro* протидіють апоптозу цих клітин, індукованому окислювальним стресом. Більш того, HSPA8 надмірно експресується у множинній мієломі і карциномі товстої кишки, а індукована BCR-ABL1 експресія HSPA8 сприяє виживанню клітин при хронічному мієлолейкозі (Chatterjee et al., 2013; Dadkhah et al., 2013; Jose-Eneriz et al., 2008; Kubota et al., 2010; Wang et al., 2013a).

15 HSPG2 асоціюється з меланомою, пласкоклітинною карциномою порожнини рота, світлоклітинною нирково-клітинною карциномою і пухлинами передміхурової залози, а його знижена експресія була виявлена у гепатоцелюлярній карциномі і пухлині товстої кишки (Nikitovic et al., 2014; Warren et al., 2014; Gbormittah et al., 2014; Zaghloul et al., 2015; Kawahara et al., 2014; Suhovskih et al., 2015; 2015; Elewa et al., 2015; Lai et al., 2011).

20 HTRA1 асоціюється з гепатоцелюлярною карциномою, лімфомою маргінальної зони селезінки, пласкоклітинною карциномою і нейробластомою, і було показано, що його активність знижена при раку шлунка, раку молочної залози, раку жовчного міхура і аденокарциномі легенів (Xu et al., 2014; D'Angelo et al., 2014; Fujinaga et al., 2014; Sahasrabudhe et al., 2014; Franco et al., 2015; Arribas et al., 2015; Zhao et al., 2015b; Bao et al., 2015).

25 Було показано, що активність HTRA3 підвищена при пласкоклітинній карциномі порожнини рота і карциномі щитоподібної залози і знижена при раку яєчника, раку молочної залози, раку ендометрію і раку легенів, і що існує зв'язок між ним і колоректальним раком і що він може бути потенційним прогностичним біомаркером раку порожнини рота (Karagiannis et al., 2014; Zhao et al., 2014; Moriya et al., 2015; Narkiewicz et al., 2009; Belefard et al., 2010; Zurawa-Janicka et al., 2012; Yin et al., 2013).

30 IGF2BP3 кодує зв'язувальний білок 3 іРНК гена, що кодує інсуліноподібний фактор росту II, онкофетальний білок, який пригнічує трансляцію інсуліноподібного фактора росту II (RefSeq, 2002). Дослідження *in vitro* показали, що IGF2BP3 сприяє проліферації, адгезії і інвазії пухлинних клітин. Більш того, було показано, що IGF2BP3 асоціюється з агресивними формами раку і з поширеною формою раку (Bell et al., 2013; Gong et al., 2014). Надмірну експресію IGF2BP3 було описано у багатьох видах раку. Вона корелює з несприятливим прогнозом, пізніми стадіями розвитку пухлини і наявністю метастазів, наприклад, при нейробластомі, колоректальній карциномі, внутрішньопечінковій холангіокарциномі, гепатоцелюлярній карциномі, раку передміхурової залози і нирково-клітинній карциномі (Bell et al., 2013; Findeis-Hosey and Xu, 2012; Hu et al., 2014; Szarvas et al., 2014; Jeng et al., 2009; Chen et al., 2011; Chen et al., 2013; Hoffmann et al., 2008; Lin et al., 2013; Yuan et al., 2009).

45 Щойно отримані і рекурентні делеції у IGLC1 були виявлені у 3 із 45 пацієнтів, у яких спостерігалася резистентність до інгібіторів тирозинкінази (ITK) при хронічному мієлоїдному лейкозі (ХМЛ) (Nowak et al., 2010).

Втрата гетерозиготності за IGLC2 була показана у 50 % інформативних випадків внутрішньочерепних менінгіом (Kim et al., 1993).

50 IGLJ3 є з'єднувальним геном, широко застосовним для складання переважного легкого ланцюга Ig-лямбда при лейкозі ворсистих клітин (Forconi et al., 2008).

IGLV2-14 є третім за поширеністю геном IGLV при хронічному лімфоцитарному лейкозі (ХЛЛ) у порівнянні з відповідним репертуаром генів із нормальних, аутореактивних і неопластичних клітин (Stamatopoulos et al., 2005).

55 IGLV2-21 є найбільш поширеним геном IGLV при хронічному лімфоцитарному лейкозі (ХЛЛ) у порівнянні з відповідним репертуаром генів із нормальних, аутореактивних і неопластичних клітин (Stamatopoulos et al., 2005).

Рівень експресії INADL знижується при недрібноклітинному раку легенів у відповідь на комбіновану хіміотерапію цисплатином і гемцитабіном (Ma et al., 2015).

Було показано, що активність ITGA3 підвищена при колоректальній карциномі і асоціюється з раком передміхурової залози, епідермоїдній карциномі, ранніх стадіях карциноми шлунка і остеосаркомі (Yang et al., 2014c; Chong et al., 2014; Lustosa et al., 2014; Ren et al., 2014; Bauer et al., 2014; Mertens-Walker et al., 2015).

ITGB4 асоціюється з раком передміхурової залози, раком шлунка, раком молочної залози, пласкоклітинною карциномою порожнини рота і раком яєчника і, як було показано, його активність підвищена при аденокарциномі протоків підшлункової залози (Chen et al., 2014b; Xin et al., 2014; Zubor et al., 2015; Masugi et al., 2015; Gao et al., 2015b; Kawakami et al., 2015). ITGB4 (також відомий під назвою CD104) виявляє тенденцію до асоціації з субодиницею альфа-6 і, ймовірно, відіграє головну роль у біологічних властивостях декількох інвазивних карцином, таких як пласкоклітинна карцинома стравоходу, карциноми сечового міхура і яєчника (Kwon et al., 2013; Pereira et al., 2014; Chen et al., 2014b). Однонуклеотидний поліморфізм у гені ITGB4, очевидно, впливає на агресивність пухлин і виживаність і може мати прогностичне значення для пацієнтів із раком молочної залози (Brendle et al., 2008).

IVNS1ABP асоціюється з BCL1/JH-позитивними множинними мієломами і може бути потенційним прогностичним маркером множинної мієломи (Ni et al., 2012).

Було показано, що активність JAG2 підвищена при аденокарциномі протоків підшлункової залози, гепатоцелюлярній карциномі і ретинобластомі і що він асоціюється з множинною мієломою, раком ендометрію, раком передміхурової залози, остеосаркомою, раком голови та шиї і уротеліальною карциномою сечового міхура (Sun et al., 2014a; Li et al., 2014b; Carvalho et al., 2014; Xiao et al., 2014; Zhang et al., 2014a; Sasnauskiene et al., 2014; Lu et al., 2014; Hu et al., 2015; Li et al., 2013).

Гіперметилування гена KCNK15 було виявлено у декількох лініях клітин, включаючи рак товстої кишки, лейкоз і рак сечового міхура (Shu et al., 2006).

Було показано, що KIF12 надмірно експресується при раку молочної залози і асоціюється з пухлинами нирки, раком матки і раком підшлункової залози (Katoh and Katoh, 2005; Tan et al., 2012).

KLHDC7B асоціюється з пласкоклітинною карциномою шийки матки і є потенційним біомаркером пласкоклітинної карциноми шийки матки (Guo et al., 2015).

LRP2 асоціюється з гепатоцелюлярною карциномою, раком підшлункової залози, злоякісною меланою, первинною лімфомою центральної нервової системи і світлоклітинною нирково-клітинною карциномою (Fernandez-Banet et al., 2014; Andersen et al., 2015; Pedersen et al., 2010; Schuetz et al., 2005; Anderson et al., 2013).

LRK2 асоціюється з раком, пов'язаним з гормональними розладами, раком молочної залози і супутнім раком, що не є раком шкіри, у пацієнтів з хворобою Паркінсона, і, можливо, має зв'язок із раком крові у пацієнтів з хворобою Паркінсона (Ruiz-Martinez et al., 2014; Agalliu et al., 2015; Inzelberg et al., 2012).

MASS1 надмірно експресується при багатьох видах ракових пухлин, включаючи рак шлунка, колоректальний рак, рак легенів і рак молочної залози, і асоціюється з прогресуванням раку, метастазуванням і низькою виживаністю пацієнтів (Huang et al., 2013; Ma et al., 2013; Stein, 2013; Wang et al., 2015a; Wang et al., 2015c; Ilm et al., 2015). MASS1 сприяє канцерогенезу шляхом націлювання на бета-катеніновий сигнальний шлях і сигнальний шлях PI3K/Akt, що призводить до підвищення рівню c-Met і бета-катеніну і їх низхідних генів-мішеней, включаючи c-Myc, циклін D1, caspase9, BAD і MMP9 (Zhen et al., 2014; Yao et al., 2015).

Надмірна експресія MAGED2 асоціюється з меланою, раком молочної залози і раком товстої кишки (Li et al., 2004; Strelakova et al., 2015).

Як було показано, активність MET підвищена при дедиференційованій ліпосаркомі і його рівень асоціюється з меланоцитними пухлинами, гепатоцелюлярною карциномою, недрібноклітинним раком легенів, спадковим папілярним раком нирки і аденокарциномами шлунка (Petrini, 2015; Finocchiaro et al., 2015; Steinway et al., 2015; Bill et al., 2015; Yeh et al., 2015).

NAT8 асоціюється з лімфобластним лейкозом (Mak et al., 2014).

NDRG1 є супресором метастазів при таких видах раку як рак підшлункової залози, і, як було показано, його активність знижена при раку передміхурової залози і раку товстої кишки, у той час як його активність підвищена при гепатоцелюлярній карциномі і аденокарциномі шийки матки (Nishio et al., 2008; Cheng et al., 2011; Bae et al., 2013; Richardson et al., 2013).

Було показано, що активність NLRC5 знижена у лініях пухлинних клітин, отриманих із лімфоїдних тканин (Staehli et al., 2012).

Активність NPTX2 знижується шляхом гіперметилування промотору при раку підшлункової залози, саркомі Юінга і гліобластомі (Zhang et al., 2012b; Alholle et al., 2013; Shukla et al., 2013).

NQO2 асоціюється з раком ендометрію, папілярною мікрокарциномою щитоподібної залози і раком стравоходу (Hevir-Kene and Rizner, 2015; Malik et al., 2012; Lee et al., 2013).

Рівень експресії OPN3 знижується у клітинних лініях Bel7402 і HepG2 5-фторурацил-резистентної гепатоцелюлярної карциноми у порівнянні з клітинами чутливих до 5-фторурацилу ліній Bel7402 і HepG2 (Jiao et al., 2012).

PDZD2 асоціюється з нейроендокринними пухлинами тонкої кишки і раком передміхурової залози (Tam et al., 2006; Rehfeld et al., 2014).

Надмірна експресія PDZK1 може відігравати роль у резистентності множинної мієломи до лікарських засобів (RefSeq, 2002).

Як було показано, активність PFKFB3 підвищена при раку шлунка, раку товстої кишки, раку легенів, раку молочної залози і асоціюється з раком підшлункової залози, раком передміхурової залози і гліобластомою (Minchenko et al., 2014; Fleischer et al., 2011; Ragnum et al., 2013).

PLCB1 асоціюється з первинною пласкоклітинною карциномою голови та шиї, мієлоїдним лейкозом і мультиформною гліобластомою (Guerrero-Preston et al., 2014; Waugh, 2014; Ramazzotti et al., 2011).

PLIN2 бере участь у накопиченні ліпідів і є плазматичним біомаркером для виявлення колоректального раку на ранніх стадіях (Matsubara et al., 2011). Рівень PLIN2 значуще підвищений у пацієнтів із світлоклітинними карциномами і з папілярною формою нирково-клітинної карциноми у порівнянні з пацієнтами контрольної групи. Доопераційний рівень концентрації PLIN2 в сечі відповідає розміру і стадії розвитку пухлини (Morrissey et al., 2014). Експресія PLIN2 значуще підвищена у зразках аденокарциноми легенів у порівнянні з нормальними тканинами і пласкоклітинними карциномами легенів (Zhang et al., 2014b).

Експресія PLOD1 асоціюється з прогресуванням раку молочної залози (Gilkes et al., 2013).

Було показано, що активність PRKCDP знижена при метастазах раку молочної залози у головний мозок і при первинному раку молочної залози. Крім цього, PRKCDP асоціюється з раком молочної залози, колоректальним раком, раком ендометрію, раком легенів і раком шлунка (Bai et al., 2012; Moutinho et al., 2014; Li et al., 2015; Tong et al., 2012; Wikman et al., 2012).

Як було показано, активність RASGRP3 підвищена при гліобластомі, раку молочної залози і меланомі людини і асоціюється з раком передміхурової залози, гепатоцелюлярною карциномою і різними видами раку порожнини рота (Nagy et al., 2014; Sowalsky et al., 2015; Lee et al., 2015; Yang et al., 2011; Bhatnagar et al., 2012; Martinez-Lopez et al., 2012).

RCN1 локалізується у плазматичній мембрані клітин ліній раку ендотелію і передміхурової залози людини (RefSeq, 2002). Експресія RCN1 підвищена у хворих на рак молочної залози (Amatschek et al., 2004).

Існує зв'язок між REN і нирково-клітинною карциномою, раком підшлункової залози, десмопластичною дрібнокруглоклітинною пухлиною і пухлиною з юстагломерулярних клітин (Elouazzani et al., 2014; Lee et al., 2014; Nakai et al., 2015; Araujo et al., 2015).

Було показано, що активність RGS5 знижена при раку легенів, підвищена при світлоклітинній нирково-клітинній карциномі, гепатоцелюлярній карциномі, декількох підтипів лімфоми і аденомі паращитоподібної залози, і що він асоціюється з колоректальним раком, нейробластомою, раком яєчника, недрібноклітинним раком легенів і раком шлунка (Volz et al., 2015; Xu et al., 2015; Wang et al., 2010a; Dannenmann et al., 2013; Koh et al., 2011; Huang et al., 2012b; Altman et al., 2012; Kumps et al., 2013; Sethakorn and Dulin, 2013; Hu et al., 2013).

RPGRIP1L пригнічує без'якірний ріст частково за рахунок білка Mad2 контрольної точки мітозу і є кандидатом у гени-супресори пухлин гепатоцелюлярної карциноми (Lin et al., 2009).

Було показано, що активність RRAD знижена при раку легенів, раку яєчника і назофарингеальній карциномі і що він асоціюється з мультиформною гліобластомою, пласкоклітинною карциномою стравоходу і гепатоцелюлярною карциномою (Wang et al., 2014d; Yeom et al., 2014; Liu et al., 2015; Mo et al., 2012; Lin and Chuang, 2012; Jin et al., 2013).

Активність SEMA5B підвищена при нирково-клітинній карциномі, але на цей час його експресія не була виявлена у інших видах раку або у нормальних тканинах (Hirota et al., 2006).

Було показано, що рівень інгібіторного комплексу плазмін-альфа-2-антиплазміну є прогностичним фактором виживання хворих на недрібноклітинну карциному легенів, і низька активність альфа-2-антиплазміну спостерігалася у крові пацієнтів з карциномою передміхурової залози (Taguchi et al., 1996; Zietek et al., 1996).

Експресія SLC16A3 асоціювалася з несприятливим прогнозом у пацієнтів з гепатоцелюлярним раком і підвищеною проліферацією, міграцією і інвазією клітин у експериментах на клітинних лініях (Gao et al., 2015a). Функціональна причетність SLC16A3 до

пухлиногенезу була продемонстрована для підгрупи ракових захворювань підшлункової залози (Baek et al., 2014)

Було показано, що експресія SLC16A4 підвищена при недрібноклітинному раку легенів, аденоїдній карциномі залоз, аденокарциномі протоків підшлункової залози, пласкоклітинній карциномі порожнини рота і раку шлунка і асоціюється з раком молочної залози і гепатоцелюлярною карциномою (Baek et al., 2014; Gao et al., 2015a; Yan et al., 2014; Jensen et al., 2014; Koo and Yoon, 2015; Granja et al., 2015; Baenke et al., 2015).

Високий рівень експресії переносника органічних аніонів 2 і переносника органічних катіонів 2 є незалежним фактором передбачення сприятливого прогнозу для пацієнтів з метастатичним колоректальним раком, що отримували схему хіміотерапії FOLFOX (Tashiro et al., 2014). Експресія іРНК SLC22A2, SLC22A11, SLC28A1, SLC28A3 і SLC29A1 була зниженою у пухлинах підшлункової залози при порівнянні з непухлинними тканинами підшлункової залози (Mohelnikova-Duchonova et al., 2013a). SLC22A2 (також відомий під назвою OCT2) регулює поглинання дисплатину у проксимальних трубочках, а інгібування OCT2 захищає від тяжкої дисплатин-обумовленої нефротоксичності (Sprowl et al., 2013).

SLC47A1 асоціюється з раком передміхурової залози (Joerger et al., 2015).

Було показано, що експресія SLC6A13 підвищена при раку товстої кишки (Tran et al., 2014b).

Як було показано, активність SMYD2 підвищена при первинній пласкоклітинній карциномі стравоходу, раку молочної залози, раку печінки, раку шлунка і гострому лімфобластному лейкозі (Sakamoto et al., 2014; Komatsu et al., 2015; Nguyen et al., 2015).

SYT9 асоціюється з раком шийки матки і раком передміхурової залози і може бути потенційним біомаркером раку шийки матки (Chen et al., 2014c; Bao et al., 2011).

Було показано, що рівень експресії TGFBI підвищений при холангіокарциномі, карциномі печінки, карциномі шлунка, пласкоклітинній карциномі стравоходу і світлоклітинній нирково-клітинній карциномі. Крім цього, було показано, що TGFBI асоціюється з колоректальним раком (Lebdai et al., 2015; Ozawa et al., 2014; Zhu et al., 2015; Han et al., 2015).

THY1 є кандидатом у гени-супресори пухлин у назофарингеальній карциномі як носій антиінвазивної активності (Lung et al., 2010).

Експресія білка TIMP1 асоціюється з несприятливим прогнозом у пацієнтів з метастатичним ураженням печінки, з гострим лімфобластним лейкозом дітей і з раком молочної залози (Bunatova et al., 2012; Scrideli et al., 2010; Sieuwerts et al., 2007). TIMP1 є потенційним сироватковим маркером для виявлення раку підшлункової залози (Slater et al., 2013). TIMP1 є добре відомим маркером раку щитоподібної залози (Griffith et al., 2006).

Було показано, що активність TPI1 знижена при остеосаркомі і що він асоціюється з раком молочної залози, пласкоклітинною карциномою стравоходу, гліобластою, раком ендометрію і раком яєчника (Zamani-Ahmadmahmudi et al., 2014; Chen et al., 2014a; Yoshida et al., 2013; Khan et al., 2013b; Gao et al., 2014).

Як було показано, активність TRIP6 підвищена при саркомі Юінга, назофарингеальній карциномі і гліобластомі і він асоціюється з раком молочної залози (Pavlikova et al., 2015; Lai et al., 2010; Fei et al., 2013; Grunewald et al., 2013).

Було показано, що спостерігається інгібування транскрипції UBE2QL1 у нирковоклітинній карциномі (Wake et al., 2013).

UGDH асоціюється з колоректальним раком, раком передміхурової залози, серозною аденокарциномою яєчника, раком молочної залози і гепатоцелюлярною карциномою (Lapointe and Labrie, 1999; Konno, 2001; Fan et al., 2009; Wei et al., 2009; Wang et al., 2010b).

Поліморфізми VKORC1 можуть бути зв'язані з ризиком розвитку раку передміхурової залози (Nimptsch et al., 2009). VKORC1 впливає на концентрацію PIVKAll (білка, що утворюється за умов відсутності вітаміну K), що використовується для скринінгу на гепатоцелюлярну карциному (Wang et al., 2010c).

ПОВНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

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.

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 I

класу (MHC). Ці пептиди зазвичай складаються з 8–10 амінокислотних залишків, що отримані з білків або дефектних рибосомальних продуктів (DRIP), які містяться у цитозолі. Молекули MHC людини також визначаються як лейкоцитарні антигени людини (HLA).

Термін "Т-клітинна відповідь" означає специфічну проліферацію та активацію ефекторних функцій, індукованих пептидом *in vitro* чи *in vivo*. Для цитотоксичних Т-клітин, обмежених MHC I 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 IL-2, індукована пептидом, секреція ефекторних 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 MHC II класу (подовжені варіанти пептидів за цим винаходом), 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 винаходом суттєво відрізняються від пептидів у їхньому стані *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 винаходу 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 винаходу 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 30 амінокислотних залишків.

Пептид, олігопептид, білок або поліпептид, що кодує таку молекулу, має назву "імуногенного" (і, отже, є "імуногеном" в межах цього винаходу), якщо він здатний індукувати імунну відповідь. У межах цього винаходу імуногенність точніше визначається як здатність викликати відповідь Т-клітин. Отже, "імуногеном" може бути молекула, яка здатна індукувати імунну відповідь, і що стосується цього винаходу, молекула, що здатна індукувати відповідь Т-клітин. В іншому аспекті імуноген може бути пептидом, комплексом пептиду з MHC, 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 MHC I класу, утворюючи потрійний комплекс (альфа-ланцюг молекули MHC I класу, бета-2-мікроглобулін і пептид), який може розпізнаватися Т-клітиною, що несе відповідний Т-клітинний рецептор, який зв'язується із комплексом MHC/пептид із належної афінністю. Пептиди, які зв'язані з молекулами MHC 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 MHC I класу (молекули MHC 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 MHC I класу, які можуть експресуватися з цих локусів.

Таблиця 5. Частоти експресії F для HLA*A02 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 %

Алель	Популяція	Фенотип, розрахований із частоти алелів
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 %

Пептиди за винаходом, переважно якщо введені до складу вакцини за винаходом, як описано в цьому документі, зв'язуються з A*02. Вакцина може також містити пептиди, що універсально зв'язуються з молекулами МНС II класу. Таким чином, вакцина за винаходом може застосовуватися для лікування раку у пацієнтів, що є A*02-позитивними, у той час як немає необхідності вибору алотипів МНС II класу завдяки здатності цих пептидів до універсальності зв'язування.

Якщо пептиди, що зв'язуються з HLA-A*02, поєднати з пептидами, які зв'язуються з іншим алелем, наприклад, A*24, лікуванню можна піддати більший відсоток будь-якої популяції пацієнтів, у порівнянні з охопленням пацієнтів, у яких кожний алель МНС I класу наявний окремо. У той час як у більшості популяцій менше ніж 50 % пацієнтів може бути охоплено кожним алелем окремо, вакцина, що містить пептиди, які є епітопами HLA-A*24 і HLA-A*02, дозволяє вакцинувати принаймні 60 % пацієнтів у кожній відповідній популяції. Конкретно, наступні відсоткові долі пацієнтів будуть позитивними принаймні до одного з цих алелів у різних регіонах: США - 61 %, Західна Європа - 62 %, Китай - 75 %, Південна Корея - 77 %, Японія - 86 % (розраховано з даних www.allele frequencies.net).

У переважному втіленні термін "нуклеотидна послідовність" стосується гетерополімеру дезоксирибонуклеотида.

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 винаходом, 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, які отримані з оперона мікроорганізму або вірусу.

Термін "нуклеотидне кодування пептиду" 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.

Для цілей цього винаходу посилання 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. Такі полінуклеотиди можуть бути часткою вектора, і (або) такі полінуклеотиди чи поліпептиди можуть становити частину композиції і все ж таки бути виділеними, якщо такий вектор чи композиція не є частиною свого природного середовища.

Ці полінуклеотиди та рекомбінантні чи імуногенні поліпептиди, розкриті відповідно до цього винаходу, також можуть бути в "очищений" 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, котрий має чистоту переважно в 99,999, або принаймні в 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 винаходу, 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 маються на увазі збагачені препарати приблизно в 0,5 %, 1 %, 5 %, 10 % та 20 % за масою. Послідовності, конструкції, вектори, клони та інші матеріали, які складають цей винахід, 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 винаходу, 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

(iiii) 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, цей винахід також стосується пептиду, що містить послідовність, вибрану з групи послідовностей від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 114 або їхній варіант, який на 88 % є гомологічним послідовностям від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 114 або їхнього варіанту, який викликає перехресну реакцію Т-клітин із зазначеним пептидом. Пептиди за винаходом здатні зв'язуватися з молекулою головного комплексу гістосумісності (МНС) людини I класу, або подовжені версії згаданих пептидів - з молекулою II класу.

У цьому винаході 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 залишку іншої природно існуючої амінокислоти 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: 114. 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 МНС, такої як HLA-A*02 або -DR, і у такий спосіб принаймні зберігати чи навіть поліпшувати здатність зв'язуватися з ТКР активованих Т-клітин.

Ці Т-клітини можуть згодом вступати в перехресну реакцію із клітинами і знищувати клітини, які експресують поліпептид, що містить природну амінокислотну послідовність спорідненого пептиду як визначено в аспектах цього винаходу. 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 щілину. Отже, фахівець у цій галузі зможе модифікувати амінокислотну послідовність від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 114, зберігаючи відомі якірні залишки, і буде здатний визначити, чи зберігають такі варіанти здатність зв'язувати молекули МНС I або II класу. Варіанти за цим винаходом зберігають здатність зв'язуватися з ТКР активованої Т-клітини, який потім може вступати в перехресну реакцію з- і знищувати клітини, які експресують поліпептид, що містить природну амінокислотну послідовність спорідненого пептиду як визначено в аспектах винаходу.

Первісні (немодифіковані) пептиди, що розкриваються в цьому винаході, 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. 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, котра 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 винаходу та все ж охоплюються розкриттям в ньому. Крім того, нестандартні амінокислоти (тобто інші, ніж стандартні амінокислоти природних білків), також можуть використовуватися для заміщення з метою отримання імуногенів та імуногенних поліпептидів відповідно до цього винаходу.

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 досліджуватися 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'язуватися з молекулою головного комплексу гістосумісності (МНС) людини I або II класу суттєво змінилася або піддалася негативному впливу у порівнянні з немодифікованим пептидом. У іншому 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'язуватися 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 Т-клітинним рецептором, 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 винаходом може бути будь-яким пептидом (до цього терміну автори винаходу відносять олігопептид чи поліпептид), котрий включає амінокислотні послідовності або їхню частину чи її варіант, як він є.

Таблиця 6

Варіанти і мотив пептидів відповідно до SEQ ID NO: 1, 4 і 5

Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO: 1	A	L	I	V	S	L	P	Y	L
Варіант									V
									I
									A
		M							V
		M							I
		M							
		M							A
		A							V
		A							I
		A							
		A							A
		V							V
		V							I
		V							
		V							A
		T							V
		T							I
		T							
		T							A
		Q							V
		Q							I
		Q							
		Q							A
Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO: 4	F	L	S	Q	D	I	I	T	V
Варіант									I
									L
									A
		M							
		M							I
		M							L
		M							A
		A							
		A							I
		A							L

Продовження таблиці 6

		A							A
		V							
		V							I
		V							L
		V							A
		T							
		T							I
		T							L
		T							A
		Q							
		Q							I
		Q							L
		Q							A
Позиція	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO: 5	Y	L	Y	P	N	L	T	R	L
Варіант									V
									I
									A
		M							V
		M							I
		M							
		M							A
		A							V
		A							I
		A							
		A							A
		V							V
		V							I
		V							
		V							A
		T							V
		T							I
		T							
		T							A
		Q							V
		Q							I
		Q							
		Q							A

Більш довгі (подовжені) пептиди також можуть бути придатними. Можливо, щоб епітопи комплексу МНС І класу, хоча вони мають зазвичай довжину 8-11 амінокислот, утворювались шляхом процесингу з більш довгих пептидів чи білків, які включають фактичний епітоп. Бажано, щоби бокові залишки фактичного епітопу не завдавали значного впливу на протеолітичне розщеплення, необхідне для презентації фактичного епітопу під час процесингу.

Пептиди за цим винаходом можуть бути подовжені аж до чотирьох амінокислот, тобто 1, 2, 3 або 4 амінокислоти можуть біти додані до будь-якого кінця у будь-якій комбінації між 4:0 і 0:4. Комбінації подовжень за цим винаходом можуть бути проілюстровані у Таблиці 7.

Таблиця 7

Комбінації подовжень у пептидах за цим винаходом

C-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	C-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

5

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

Отже, епітопи відповідно цього винаходу 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.

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.

Відповідно, за цим винаходом 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.

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

Переважно, коли Т-клітини, специфічні по відношенню до пептиду за цим винаходом, 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.

У особливо переважному втіленні цього винаходу пептид складається або по суті складається з амінокислотної послідовності від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 114.

"По суті складається з" означає, що пептид за винаходом, на додаток до послідовності відповідно до будь-якої послідовності від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 114 чи його варіант, містить додаткові N- та/або C-термінальні фрагменти послідовності амінокислот, які не обов'язково формують частину пептиду, що функціонує як епітоп для молекул МНС.

Проте ці фрагменти можуть бути важливими для забезпечення ефективного введення пептиду відповідно до цього винаходу в клітини. В одному з втілень цього винаходу пептид є частиною гібридного білка, який містить, наприклад, 80 N-термінальних амінокислот HLA-DR-антиген-асоційованого інваріантного ланцюга (p33, надалі "Ii"), одержаного з NCBI, інвентарний номер в генному банку (GenBank) X00497. У інших злиттях пептиди за цим винаходом можуть

бути злиті з антитілом, як описано в цьому документі, або з його функціональною частиною, зокрема з послідовністю антитіла, щоби бути специфічно націленими згаданими антитілами, або, наприклад, злиті з антитілом або з послідовністю антитіла, що є специфічним до дендритних клітин, як описано в цьому документі.

Крім того, пептид чи його варіант може бути додатково модифікований для поліпшення його стабільності і (або) зв'язку з молекулами МНС, щоб викликати сильнішу імунну відповідь. Методи такої оптимізації пептидної послідовності добре відомі в цій галузі та включають, наприклад, введення реверсованих пептидних зв'язків чи непептидних зв'язків.

В реверсованому пептидному зв'язку амінокислотні залишки не з'єднуються пептидними зв'язками (-CO-NH-), а пептидний зв'язок реверсується. Такі ретро-інверсивні пептидні міметики можуть бути отримані методами, відомими в даній галузі, наприклад, описаними в роботі Meziere і співавт. (1997) (Meziere et al., 1997), яка включена в цей документ шляхом посилання. Такий підхід включає формування псевдо-пептидів, які містять зміни із залученням остова, а не орієнтації бокових ланцюгів. Meziere і співавт. (Meziere et al., 1997) показують, що для відповіді МНС і Т-клітин-хелперів зазначені псевдо-пептиди є прийнятними. Ретро-інверсивні пептиди, які містять зв'язки NH-CO замість пептидних зв'язків CO-NH, набагато більш стійкі до протеолізу.

Непептидний зв'язок – це, наприклад, -CH₂-NH-, -CH₂S-, -CH₂CH₂-, -CH=CH-, -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- та -CH₂SO-. У патенті США 4 897 445 пропонується метод твердофазного синтезу непептидних зв'язків (-CH₂-NH) в поліпептидних ланцюгах, що включає поліпептиди, синтезовані за допомогою стандартних методик, та непептидний зв'язок, синтезований шляхом реакції аміноальдегіду та амінокислоти в присутності NaCNBH₃.

Пептиди, що включають послідовності, описані вище, можуть бути синтезовані з додатковими хімічними групами, присутніми на їхніх аміно- і (або) карбоксильних кінцях, для посилення стабільності, біологічної доступності і (або) афінності пептидів. Наприклад, гідрофобні групи, такі як карбобензоксильні, данзильні чи трет-бутилоксикарбонільні, можуть додаватися до аміно-кінців пептидів. Подібним чином, на аміно-кінцях пептидів може розміщуватись ацетильна група чи 9-флуоренілметоксикарбонільна група. До карбоксильних кінців пептидів може бути додана також гідрофобна група, трет-бутилоксикарбонільна чи амідогрупа.

Крім того, пептиди за винаходом можуть бути синтезовані для зміни їхньої просторової конфігурації. Наприклад, може використовуватися D-ізомер одного чи кількох амінокислотних залишків пептиду, а не звичайний L-ізомер. До того ж, принаймні один з амінокислотних залишків пептидів за винаходом може замінюватись одним з добре відомих амінокислотних залишків неприродного походження. Такі заміни можуть служити для підвищення стабільності, біологічної доступності і (або) здатності до зв'язування пептидів за винаходом.

Подібним чином, пептид чи його варіант за винаходом може модифікуватися хімічно, шляхом реакції окремих амінокислот до чи після синтезу пептиду. Приклади таких модифікацій добре відомі в цій галузі та узагальнені, зокрема, в роботі R. Lundblad, Chemical Reagents for Protein Modification, 3rd ed. CRC Press, 2004 (Lundblad, 2004), яка включена в цей документ шляхом посилання. Хімічна модифікація амінокислот включає, але не обмежується ними, модифікацію шляхом ацилювання, амідинування, піридоксильовання лізину, відновлювального алкілювання, тринітробензилювання аміногруп 2,4,6-тринітробензолсульфоною кислотою (TNBS), амідну модифікацію карбоксильних груп та сульфгідрильну модифікацію шляхом окиснення пермурашиною кислотою цистеїну в цистеїнову кислоту, формування похідних ртуті, утворення змішаних дисульфідів з іншими тиольними сполуками, реакцію з імідом малеїнової кислоти, карбоксиметилування йодоцтовою кислотою чи йодацетамідом та карбамоїлування ціанатом при лужному рН, хоча способи модифікації не обмежуються наведеними тут. В цьому відношенні досвідчений фахівець може звернутися до Глави 15 публікації Current Protocols In Protein Science, Eds. Coligan et al. (John Wiley and Sons NY 1995-2000) (Coligan et al., 1995), де докладно описано методику відносно хімічної модифікації білків.

Стисло, модифікація, наприклад, аргінільних залишків часто базується на реакції віцинальних дикарбонільних сполук, таких як фенілглюксаль, 2,3-бутандіон і 1,2-циклогександіон, з утворенням адукту. Іншим прикладом є реакція метилглюксалю з аргініновими залишками. Цистеїн може бути модифікований без супутньої модифікації інших нуклеофільних сайтів, таких як лізин та гістидин. В результаті велика кількість реагентів є доступною для модифікації цистеїну. Веб-сайти таких компаній, як Sigma-Aldrich (<http://www.sigma-aldrich.com>), надають інформацію щодо конкретних реагентів.

Селективне відновлення дисульфідних зв'язків також є поширеним. Дисульфідні зв'язки можуть утворюватися і окислюватися під час теплової обробки біофармацевтичних препаратів. К-реагент Вудворда може використовуватися для модифікації деяких залишків глутамінової

кислоти. N-(3-диметиламінопропіл)-N'-етилкарбодіїмід може використовуватися для утворення внутрішньомолекулярних зшивок між залишками лізину і глутамінової кислоти. Наприклад, діетилпірокарбонат є реагентом для модифікації гістидильних залишків у білках. Для модифікації гістидину може також використовуватися 4-гідрокси-2-ноненаль. Реакція залишків лізину та інших альфа-аміногруп є, наприклад, прийнятною для зв'язування пептидів до поверхонь або поперечного зшивання білків/пептидів. Лізин є сайтом для прикріплення поліетиленгліколю і головним сайтом модифікації при глікозилюванні білків. Метіонінові залишки у білках можна модифікувати, наприклад, йодацетамідом, брометиламіном і хлораміном Т.

Тетранітрометан і N-ацетилімідазол можуть використовуватися для модифікації тирозильних залишків. Поперечне зшивання шляхом утворення дитирозину може здійснюватися пероксидом водню/іонами міді.

У недавніх дослідженнях модифікації триптофану використовувалися N-бромсукцинімід, 2-гідрокси-5-нітробензилбромід або 3-бром-3-метил-2-(2-нітрофенілмеркапто)-3H-індол (BNPS-скатол).

Успішна модифікація ПЕГ (поліетиленгліколем) терапевтичних білків та пептидів, що часто асоціюється з подовженням напівперіоду циркуляції при перехресному зшиванні білків із глутаральдегідом, поліетиленглікольдіакрилатом та формальдегідом, використовується для приготування гідрогелів. Хімічна модифікація алергенів для використання в імунотерапії часто досягається шляхом карбамоїлування ціанатом калію.

Пептид чи його варіант, де пептид є модифікованим або включає непептидні зв'язки, є переважним втіленням цього винаходу. Загалом, пептиди і їх варіанти (принаймні такі, що містять пептидні зв'язки між амінокислотними залишками) можуть бути синтезовані Fmoc-поліамідним методом твердофазного синтезу пептидів, як це розкрито у роботі Lukas і співавт. (Lukas et al., 1981) і в посиланнях, що є в ній. Тимчасовий захист N-аміногрупи забезпечується 9-флуоренілметилоксихарбонільною (Fmoc) групою. Повторювальне розщеплення цієї дуже нестійкої до дії луг захисної групи виконується за допомогою 20 % піперидину у N, N-диметилформаміді. Можна захистити функціональні групи бокових ланцюгів, такі як бутилові етери (у випадку серину, треоніну та тирозину), бутилові естери (у випадку глутамінової кислоти і аспарагінової кислоти), бутилоксикарбонільне похідне (у випадку лізину і гістидину), тритильне похідне (у випадку цистеїну) і 4-метокси-2,3,6-триметилбензосульфонільне похідне (у випадку аргініну). У сполуках, в яких C-термінальними залишками є глутамін або аспарагін, для захисту амідогруп бокових ланцюгів використовують 4,4'-диметоксибензгдрильну групу. Основою твердофазного носія є полідиметилакриламідний полімер, що складається з трьох мономерів: диметилакриламід (каркасний мономер), біс-акрилоїлетилендіаміну (компонент для перехресного зшивання) і акрилоїлсаркозинметилового естеру (функціоналізуючий агент). Як агент, що утворює зв'язок пептиду і смоли, який піддається розщепленню, використовується нестійке до дії кислот похідне 4-гідроксиметилфеноксистої кислоти. Всі амінокислотні похідні додають у вигляді заздалегідь синтезованих симетричних ангідридних похідних за винятком аспарагіну і глутаміну, які додають з використанням зворотної N, N-дициклогексилкарбодіїмід/1-гідроксибезотриазол-опосередкованої реакції сполучення. Усі реакції сполучення і зняття захисту відслідковували за допомогою методів контролю з використанням нінгдрину, тринітробензолсульфонової кислоти і ізотину. Після завершення синтезу пептиди відщеплюють від смоли-носія з супутнім видаленням захисних груп бокових ланцюгів шляхом обробки 95 % трифтороцтовою кислотою, що містить 50 % суміші поглиначів. Зазвичай використовувані поглиначі включають етандитіол, фенол, анізол і воду, конкретний вибір залежить від амінокислотних складових пептиду, що синтезується. Для синтезу пептидів можливе також використання комбінації твердофазних і рідкофазних методик (див., наприклад, (Bruckdorfer et al., 2004) і посилання, наведені в цій роботі).

Трифтороцтову кислоту видаляють випаровуванням у вакуумі з подальшим подрібнюванням із діетиловим етером, що забезпечує отримання сирого пептиду. Будь-які поглиначі, які присутні в матеріалі, видаляються простою процедурою екстракції, яка після ліофілізації водної фази дозволяє отримати сирий пептид, вільний від поглиначів. Реагенти для синтезу пептидів, як правило, можна придбати, наприклад, у компанії Calbiochem-Novabiochem (Нотінгем, Велика Британія).

Очищення може виконуватися за допомогою одного будь-якого методу або їх комбінації, таких як перекристалізація, ексклюзійна хроматографія, іонообмінна хроматографія, хроматографія гідрофобної взаємодії та (зазвичай) зворотно-фазна високоефективна рідинна хроматографія із градієнтним розділенням, наприклад, з використанням системи ацетонітрил/вода.

Аналіз пептидів може виконуватися за допомогою тонкошарової хроматографії, електрофорезу, зокрема, капілярного електрофорезу, твердофазної екстракції (ТФЕ), зворотно-фазної високоефективної рідинної хроматографії, амінокислотного аналізу після кислотного гідролізу та мас-спектрометрії із бомбардуванням прискореними атомами (FAB), а також мас-спектрометричного аналізу MALDI та ESI-Q-TOF.

Щоб вибрати надмірно презентовані пептиди, розраховується профіль презентації, який дозволяє оцінити медіану презентації у зразку, а також варіацію повторних вимірювань. Профіль зіставляє зразки пухлини, що вивчається, з фоновим рівнем зразків нормальних тканин. Кожний із цих профілів можна потім консолідувати у показник надмірної презентації, підрахувавши р-значення за допомогою лінійної моделі змішаних ефектів (Pinheiro et al., 2015), з поправкою на багаторазове тестування за методом оцінки долі хибних відхилень (Benjamini and Hochberg, 1995).

З метою ідентифікації і відносного кількісного визначення HLA-лігандів методом мас-спектрометрії молекули HLA зразків тканин після шоквої заморозки були очищені, і були виділені пептиди, що зв'язуються з молекулами HLA. Виділені пептиди були розділені, а їх послідовності були ідентифіковані методом рідинної хроматографії і мас-спектрометрії (PX-MC) у режимі реального часу з іонізацією у наноелектроспреї. Отримані пептидні послідовності були перевірені порівнянням шаблону фрагментації природних TUMAP, записаного для зразків НКК (N=18 *02-позитивних зразків), із шаблонами фрагментації відповідних синтетичних контрольних пептидів із ідентичними послідовностями. Оскільки було безпосередньо виявлено, що пептиди є лігандами молекул HLA на клітинах первинних пухлин, ці результати надали прямі докази природного процесингу і презентації ідентифікованих пептидів на тканинах первинних ракових пухлин, отриманих від 18 пацієнтів, хворих на НКК.

Патентовані інформаційні канали з наукової розробки XPRESIDENT® v2.1 (див., наприклад, заявку США 2013-0096016, яка таким чином включена в цей документ шляхом посилання в усій повноті) дозволяють ідентифікувати і виділяти відповідні кандидати у вакцини на базі надмірно презентованих пептидів, застосовуючи метод прямого відносного кількісного визначення рівнів HLA-рестрикованих пептидів на ракових тканинах у порівнянні з декількома різними нераковими тканинами і органами. Цього вдалося досягти за рахунок розробки методу диференційного кількісного визначення на основі даних PX-MC без використання ізотопної мітки, що були оброблені патентованими інформаційними каналами аналізу даних, в яких об'єднані алгоритми для ідентифікації послідовностей, спектральної кластеризації, підрахунку іонів, вирівнювання часу утримання, деконволюції за зарядовими станами і нормалізації.

Були встановлені рівні презентації, включаючи оцінку похибок для кожного пептиду і зразка. Були ідентифіковані пептиди, що презентуються виключно на пухлинних тканинах, і пептиди, надмірно презентовані на пухлинних тканинах у порівнянні з нераковими тканинами і органами.

Комплекси HLA-пептид, отримані із зразків тканин НКК, були очищені, і пептиди, зв'язані з молекулами HLA, були виділені і проаналізовані методом PX-MC (див. приклади). Усі TUMAP, включені у цю заявку, були за допомогою цього підходу ідентифіковані на зразках первинної НКК, що підтвердило факт їх презентації на клітинах первинної НКК.

Ідентифіковані на тканинах багатьох пухлин НКК і на нормальних тканинах TUMAP були кількісно визначені методом PX-MC без застосування ізотопних міток з реєстрацією спектрів у режимі підрахунку іонів. Цей метод базується на припущенні, що площі піків PX-MC пептиду корелюють з його кількістю у зразку. Усі сигнали, які залежать від кількості пептиду, у різних експериментах за методом PX-MC, були нормалізовані на основі середніх значень, усереднені по зразках і злиті у гістограму, що має назву профілю презентації. Профіль презентації об'єднує дані різних методів аналізу, таких як пошук по базах даних для білків, спектральної кластеризації, деконволюції за зарядовими станами (розрядження) і вирівнювання часу утримання і нормалізації.

Крім того, патентовані інформаційні канали з наукової розробки XPRESIDENT® v2.1 дозволяють провести пряме визначення абсолютних значень рівнів MHC-, переважно HLA-рестрикованих пептидів на ракових та інших інфікованих тканинах. Стисло, загальне число клітин було розраховано з сумарного вмісту ДНК у зразку тканини, яку аналізують. Загальну кількість пептиду для TUMAP у зразку тканини вимірювали методом наноPX-MC/MC як співвідношення природного TUMAP і відомої кількості версії TUMAP із міченням ізотопом, так званим внутрішнім стандартом. Ефективність виділення TUMAP була визначена методом введення стандартних добавок комплексів пептид-MHC всіх вибраних TUMAP до тканинного лізату у найранішній можливій точці процедури виділення TUMAP і визначенням методом наноPX-MC/MC, після чого відбувалося закінчення процедури виділення пептидів. Загальне число клітин і загальна кількість пептиду були розраховані з результатів трьох паралельних

вимірювань на кожний зразок тканини. Ефективності виділення конкретних пептидів розраховували як середнє 10 дослідів введення стандартних добавок, кожну у трьох паралельних вимірюваннях (див. Приклад 6 і Таблицю 12).

Предметом цього винаходу є пептиди для лікування раку та інших пухлин, переважно НКК, які надмірно чи виключно презентують пептиди за цим винаходом. Ці пептиди, за даними мас-спектрометрії, презентуються природно молекулами HLA на зразках тканин первинної НКК людини.

Багато вихідних генів/білків (які також визначаються як "повнорозмірний білок" або "базовий білок"), із яких отримані пептиди, як було показано, відзначаються високою надекспресією у клітинах раку у порівнянні з нормальними тканинами - "нормальні тканини" у контексті даного винаходу означає або клітини здорової нирки, або клітини інших здорових тканин, що свідчить про високий ступінь зв'язку пухлин із вихідними генами (див. Приклад 2). Більш того, самі пептиди дуже надмірно презентуються на тканинах пухлини - "пухлинні тканини" у контексті даного винаходу означає зразок від пацієнта, що страждає на НКК, але не на нормальних тканинах (див. Приклад 1).

Зв'язані з HLA пептиди можуть розпізнаватися імунною системою, а саме Т-лімфоцитами. Т-клітини можуть руйнувати клітини, що презентують розпізнаний комплекс HLA/пептид, наприклад, клітини НКК, що презентують отримані пептиди.

Було показано, що пептиди за цим винаходом здатні стимулювати відповідь Т-клітин і (або) надмірно презентуються, і, таким чином, можуть використовуватися для отримання антитіл і (або) ТКР, таких як розчинні ТКР, за цим винаходом (див. Приклад 3, Приклад 4). Більш того, пептиди, якщо вони утворюють комплекси з відповідними молекулами МНС, також можуть використовуватися для продукції антитіл і (або) ТКР, особливо рТКР за цим винаходом. Відповідні способи добре відомі фахівцю у цій галузі, і їх описи можна знайти також у відповідній літературі. Отже, пептиди за цим винаходом можуть використовуватись для генерації імунної відповіді організму пацієнта, завдяки чому клітини пухлини можуть бути зруйновані. Імунна відповідь організму пацієнта може індукуватися прямим введенням пацієнту описаних пептидів або відповідних прекурсорних речовин (наприклад, подовжених пептидів, білків або нуклеїнових кислот, які кодуєть ці пептиди), ідеально в комбінації з агентом, що підвищує імунну реакцію (тобто ад'ювантом). Можна очікувати, що імунна відповідь, що виникає в результаті такої терапевтичної вакцинації, є високо специфічною по відношенню до клітин пухлини, оскільки цільові пептиди за цим винаходом не є присутніми на нормальних тканинах у достатній кількості копій, що попереджає ризик небажаних аутоімунних реакцій проти нормальних клітин в організмі пацієнта.

Цей винахід також стосується Т-клітинних рецепторів (ТКР), що містять альфа-ланцюг і бета-ланцюг ("альфа/бета ТКР"). Предметом цього винаходу також є пептиди, здатні зв'язуватися з ТКР і антитілами, якщо вони презентуються молекулою МНС. Цей опис стосується також нуклеїнових кислот, векторів і клітин-хазяїв для експресії ТКР і пептидів за цим описом і способів їх використання.

Термін "Т-клітинний рецептор" (скорочено ТКР) означає гетеродимерну молекулу, що містить альфа-поліпептидний ланцюг (альфа-ланцюг) і бета-поліпептидний ланцюг (бета-ланцюг), де гетеродимерний рецептор здатний зв'язуватися з пептидним антигеном, що презентується молекулою HLA. Цей термін також охоплює так звані гамма/дельта ТКР.

В одному з втілень пропонується спосіб отримання ТКР, як описано у цьому документі, де згаданий спосіб включає культивування клітини-хазяїна, здатної експресувати ТКР за умов, прийнятних для сприяння експресії цих ТКР.

Цей винахід в іншому аспекті стосується способів 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 або антиген навантажують на тетрамери МНС I або II класу шляхом тетрамеризації мономерних комплексів антиген/МНС I або II класу.

Альфа- і бета-ланцюги альфа/бета ТКР і гамма- і дельта-ланцюги гамма/дельта ТКР взагалі вважаються як такі, кожний із яких має два "домени", а саме варіабельні і константні домени. Варіабельний домен складається з послідовно розташованих варіабельного сегменту (V) і з'єднувального сегменту (J). Варіабельний домен може також включати лідерний сегмент (L). Бета- і дельта-ланцюги можуть також включати D-сегмент. Альфа- і бета- константні домени можуть також містити С-кінцеві трансмембранні (ТМ) домени, які заякорюють альфа- і бета-ланцюги на клітинній мембрані.

Що стосується гамма/дельта ТКР, термін "гамма-варіабельний домен ТКР" у тому вигляді, в якому він використовується тут, означає зчеплення сегменту гамма V ТКР (TRGV) без лідерного

сегменту (L) і сегменту ТКР гамма J (TRGJ), а термін "константний домен ТКР гамма" означає позаклітинний сегмент TRGC або С-кінцеву усічену послідовність TRGC. Подібним чином, термін "дельта-варіабельний домен ТКР" означає зчеплення сегменту ТКР дельта V (TRGV) без лідерного сегменту (L) і сегменту ТКР дельта D/J (TRDD/TRDJ), а термін "константний домен ТКР дельта" означає позаклітинний сегмент TRDC або С-кінцеву усічену послідовність TRDC.

ТКР за цим описом переважно з'єднуються з комплексом пептид-молекула HLA зі спорідненістю (KD) приблизно 100 мкМ або менше, приблизно 50 мкМ або менше, приблизно 25 мкМ або менше, або приблизно 10 мкМ або менше. Більш переважними є високоафінні ТКР, які мають спорідненості приблизно 1 мкМ або менше, приблизно 100 нМ або менше, приблизно 50 нМ або менше, приблизно 25 нМ або менше. Приклади, що не мають обмежувального характеру, переважних діапазонів спорідненості для ТКР за цим винаходом включають від приблизно 1 нМ до приблизно 10 нМ, від приблизно 10 нМ до приблизно 20 нМ, від приблизно 20 нМ до приблизно 30 нМ, від приблизно 30 нМ до приблизно 40 нМ, від приблизно 40 нМ до приблизно 50 нМ, від приблизно 50 нМ до приблизно 60 нМ, від приблизно 60 нМ до приблизно 70 нМ, від приблизно 70 нМ до приблизно 80 нМ, від приблизно 80 нМ до приблизно 90 нМ, від приблизно 90 нМ до приблизно 100 нМ.

В тому виді, в якому він використовується тут, у зв'язку з ТКР за цим винаходом, "специфічне зв'язування" та його граматичні варіанти використовуються для позначення ТКР, що має спорідненість (KD) для комплексу пептид-молекула HLA 100 мкМ або менше.

Альфа/бета гетеродимерні ТКР за цим винаходом можуть мати введені дисульфідні зв'язки між їх константними доменами. Переважними ТКР цього типу включають такі, що мають послідовність константних доменів TRAC і послідовність константних доменів TRBC1 або TRBC2, за винятком того, що Thr 48 послідовності TRAC і Ser 57 послідовності TRBC1 або TRBC2 заміщені залишками цистеїну, причому згадані цистеїни утворюють дисульфідний зв'язок між послідовністю константних доменів TRAC і послідовністю константних доменів TRBC1 або TRBC2 Т-клітинного рецептору.

З введенням згаданим вище міжланцюговим зв'язком або без нього, альфа/бета гетеродимерні ТКР за цим винаходом можуть мати послідовність константних доменів TRAC і послідовність константних доменів TRBC1 або TRBC2, а послідовність константних доменів TRAC і послідовність константних доменів TRBC1 або TRBC2 Т-клітинного рецептору можуть бути з'єднані природним дисульфідним зв'язком між Cys4 екзону 2 у TRAC і Cys2 екзону 2 у TRBC1 або TRBC2.

ТКР за цим описом можуть включати детектовану мітку, вибрану з групи, що складається з радіонукліду, флуорофору і біотину. ТКР за цим описом можуть бути кон'юговані з терапевтично активною речовиною, такою як радіонуклід, хіміотерапевтичний препарат або токсин.

У одному втіленні ТКР за цим винаходом, що має принаймні одну мутацію в альфа-ланцюгу і (або) має принаймні одну мутацію у бета-ланцюгу, має модифіковане глікозилювання у порівнянні з немутованим ТКР.

У одному втіленні ТКР, що містить принаймні одну мутацію в альфа-ланцюгу і (або) у бета-ланцюгу ТКР має спорідненість до і (або) напівперіод зв'язування з комплексом пептид-молекула HLA, які принаймні вдвічі вище таких для ТКР, що містить немутований альфа-ланцюг ТКР і (або) немутований бета-ланцюг ТКР. 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. 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 високореактивними по відношенню до цих антигенів, будуть піддаватися негативному відбору у тимусі у процесі, відомому як центральна толерантність, що означає, що залишаться лише Т-клітини з низькоафінними ТКР до аутоантигенів. Таким чином, афінність ТКР або їх варіантів за цим описом до пептидів за цим винаходом можна підвищити методами, добре відомими фахівцям у цій галузі.

Цей винахід також стосується способу ідентифікації і виділення ТКР відповідно до цього опису, причому згаданий спосіб включає інкубування МКПК, отриманих у HLA-A*02-негативних здорових донорів, із А2/пептидними мономерами, інкубування МКПК з тетрамер-фікоеритрином

(ФЕ) і виділення високоавідних Т-клітин методом флуоресцентного сортування клітин на аналізаторі FACS Calibur.

Цей винахід також стосується способу ідентифікації і виділення 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 п. н.), Т-клітини якої експресують широкий спектр ТКР людини, які компенсують дефіцит ТКР у миші, імунізацію миші досліджуванним пептидом, інкубування МКПК, отриманих від трансгенної миші, з тетрамер-фікоеритрином (ФЕ) і виділення високоавідних Т-клітин методом флуоресцентного сортування клітин на аналізаторі FACS Calibur.

Згідно з одним аспектом винаходу, для отримання Т-клітин, що експресують ТКР за цим винаходом, нуклеїнові кислоти, які кодують ТКР-альфа і (або) ТКР-бета ланцюги за цим винаходом, клонують у вектори експресії, такі як гамма-ретровірус або лентівірус. Рекombінантні віруси отримують, а потім перевіряють 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. У іншому аспекті, з метою отримання Т-клітин, які експресують ТКР за цим описом, синтезують РНК ТКР за методиками, відомими фахівцям у цій галузі, наприклад, використанням систем транскрипції *in vitro*. Синтезовані *in vitro* РНК ТКР потім вводять у первинні CD8+ Т-клітини, отримані від здорових донорів електропорацією для повторної експресії альфа- і (або) бета-ланцюгів ТКР, специфічних для пухлини.

З метою підвищення рівня експресії нуклеїнові кислоти, що кодують ТКР за цим описом, можна функційно зв'язати із сильними промоторами, такими 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, фактор елонгації (EF)-1a і промотор вірусу некрозу селезінки (SFFV). У переважному втіленні промотор є гетерологічним по відношенню до нуклеїнової кислоти, що експресується. На додаток до сильних промоторів, касети експресії ТКР за цим описом можуть містити додаткові елементи, які можуть посилити трансгенну експресію, включаючи центральний поліпуриновий тракт (сРРТ), який сприяє ядерній транслокації лентівірусних конструкцій (Follenzi і співавт., 2000), посттранскрипційний регуляторний елемент вірусу гепатиту Вучук американських байбаків (wPRE), який підвищує рівень трансгенної експресії шляхом підвищення стабільності РНК (Zufferey і співавт., 1999).

Альфа- і бета-ланцюги ТКР за цим винаходом можуть кодуватися нуклеїновими кислотами, розташованими у різних векторах, або кодуватися полінуклеотидами, розташованими у одному і тому ж векторі.

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 і співавт. 2009).

Нуклеїнові кислоти, що кодують ТКР за цим описом, можуть бути кодон-оптимізовані для підвищення рівня експресії клітиною-хазяїном. 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 і співавт., 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 і співавт., 2006).

Крім того, порушення парування між введеними і ендогенними 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 і співавт., 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 ендогенним 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); перестановка 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 і співавт. 2009).

У одному втіленні клітина-хазяїн отримана методами генної інженерії з метою експресувати ТКР за цим описом. У переважних втіленнях клітина-хазяїн є Т-клітиною людини або попередником Т-клітини людини. У деяких втіленнях Т-клітина або попередник Т-клітини отримані від хворого на рак пацієнта. У інших втіленнях Т-клітина або попередник Т-клітини отримані від здорового донора. Клітини-хазяї за цим описом можуть бути алогенними або аутологічними по відношенню до пацієнта, якого належить лікувати. У одному втіленні клітиною-хазяїном є гамма/дельта Т-клітина, трансформована для експресії альфа/бета ТКР.

"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 у вільній формі, або у формі фармацевтично прийнятної солі (див. також вище). Термін "фармацевтично прийнятна 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 прийнятної основи, такої як гідроксид натрію, гідроксид калію, гідроксид амонію, гідроксид кальцію, триметиламін і тому подібні.

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

Переважно, лікарський засіб за цим винаходом є імунотерапевтичним засобом, таким як вакцина. Вона може вводитися безпосередньо пацієнту, в уражений орган або системно в/ш, в/м, п/ш, в/ч і в/в, або вноситися *ex vivo* у клітини, отримані від пацієнта, чи у клітинну лінію людини, котрі згодом вводяться пацієнту, або використовуватись *in vitro* для селекції субпопуляції з імунних клітин, які отримані від пацієнта і які потім знов вводяться йому. Якщо нуклеїнова кислота вводиться у клітини *in vitro*, тоді може бути корисним, щоби клітини були трансфектованими, щоби спільно експресувати імуностимулюючі цитокіни, наприклад, інтерлейкін-2. Пептид може бути, по суті, чистим, або поєднаним з імуностимулюючим ад'ювантом (див. нижче), чи використовуватись в комбінації з імуностимулюючими цитокінами, або вводиться з належною системою доставки, наприклад, ліпосомами. Пептиди також можуть бути кон'юговані з належним носієм, таким як гемоціанін фісурели (KLH) або маннан (див. патентну заявку WO 95/18145 та роботу (Longenecker et al., 1993)). Пептид також може бути міченим або бути злитим білком чи гібридною молекулою. Очікується, що пептиди, послідовності яких наведені у цьому винаході, стимулюють CD4 або CD8 Т-клітини. Проте стимуляція CD8Т-клітин є більш ефективною за умови сприяння з боку CD4 Т-хелперних клітин. Таким чином, для епітопів МНС І класу, які стимулюють CD8 Т-клітини, партнер по злиттю або сегменти гібридної молекули принагідно постачають епітопи, які стимулюють CD4-позитивні Т-клітини. CD4- і CD8-стимулюючі епітопи добре відомі фахівцям в цій галузі і включають епітопи, ідентифіковані в цьому винаході.

Згідно з одним аспектом винаходу, вакцина містить принаймні один пептид, який має амінокислотну послідовність від SEQ ID NO:1 до SEQ ID NO:114, і принаймні один додатковий пептид, переважно, від двох до 50, більш переважно, від двох до 25, ще більш переважно, від двох до 20, і найбільш переважно, два, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять, десять, одинадцять, дванадцять, тринадцять, чотирнадцять, п'ятнадцять, шістнадцять, сімнадцять або вісімнадцять пептидів. Пептид(и) може (можуть) бути виділений (виділені) з одного або більшої кількості специфічних ТАА і може (можуть) зв'язатися з молекулами МНС І класу.

Згідно з ще одним аспектом винаходу пропонується нуклеїнова кислота (наприклад, полінуклеотид), що кодує пептид чи його варіант за винаходом. 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 винаходу, пропонується вектор експресії, здатний експресувати поліпептид відповідно до винаходу.

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.

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.

У бажаному методі модифікації ДНК, що кодує поліпептид за винаходом, використовується полімеразна ланцюгова реакція, як це розкрито у роботі Saiki RK і співавт. (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.

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 винаходом. Таким чином, ДНК, яка кодує пептид чи його варіант за винаходом, 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 здатність експресувати і виробляти пептиди за винаходом. 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.

Ця ДНК (або, у випадку ретровірусного вектора, РНК), яка кодує поліпептид, що є предметом цього винаходу, 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.

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

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

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 СНО, 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 неомицин. 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. Плазмиди pRS403, pRS404, pRS405 і pRS406 є дріжджовими інтегруючими плазмідами (YIp) і включають дріжджові селективні маркери HIS3, TRP1, LEU2 і URA3. Плазмиди 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, c-myc 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 pMB1 (похідне pBR322) 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 препротрисину (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 винаходом 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 винахід також стосується клітини-хазяїна, трансформованої полінуклеотидною векторною конструкцією за винаходом. 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 фібробластних клітин 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 трансфected векторами експресії бациловірусу. 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 винаходом здійснюється добре відомими методами, вибір яких, як правило, залежить від типу вектора, що використовується. Щодо трансформації прокаріотичних клітин-хазяїв див., наприклад, Cohen і співавт. (Cohen et al., 1972) і (Green and Sambrook, 2012). Трансформація дріжджових клітин описана в роботі Sherman і співавт. (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, наприклад, клітини, що містять ДНК-конструкцію за цим винаходом, 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 винаходом здатні синтезувати пептиди за винаходом, 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 винаходом, які можуть бути навантажені на відповідні молекули МНС. Отже, цей винахід також стосується клітини-хазяїна, що містить нуклеїнову кислоту або вектор експресії за цим винаходом.

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 (РАР), для лікування метастатичного НRPC (гормон-рефрактерного раку передміхурової залози), що протікає безсимптомно або з мінімально вираженими симптомами (сіпулейцел-Т) (Rini et al., 2006; Small et al., 2006).

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

В іншому втіленні пептид, нуклеїнова кислота або вектор експресії за винаходом застосовуються у медицині. Наприклад, пептид або його варіант може бути приготований для 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 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 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, наприклад, ДНК, кДНК, ПНК, РНК чи їхньою комбінацією. Методи конструювання і введення такої нуклеїнової кислоти добре відомі фахівцям в цій галузі. Їх огляд наведений, наприклад, у роботі Teufel і співавт. (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 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 кодується нуклеїновою кислотою, може (можуть) бути злитим білком, наприклад, з епітопом, що стимулює Т-клітини щодо відповідних протилежних CDR, як відзначається вище.

Лікарський засіб за винаходом може також включати один або більше ад'ювантів. Ад'юванти є речовинами, які у неспецифічний спосіб підвищують або підсилюють імунну відповідь (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 винаходом. Відповідні ад'юванти включають, але не обмежуються ними, 1018 ISS, солі алюмінію, AMPLIVAX®, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, флагелін чи ліганди TLR5, які походять з флагеліну, ліганд FLT3, GM-CSF, IC30, IC31, іміквімод (ALDARA®), резиквімод, ImuFact IMP321, інтерлейкіни, такі як ІЛ-2, ІЛ-13, ІЛ-21, інтерферон-альфа чи -бета, або їхні 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", ОК-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, векторну систему PerTel®, 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, Ribi's Detox, Quil чи 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).

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. Активація 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 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), котрі 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 винаходом. 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 ds-PHK, 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-, анти-TNFα-рецептори) та SC58175, які можуть діяти терапевтично і (або) як ад'юванти. Кількості та концентрації ад'ювантів та добавок, прийнятих в контексті цього винаходу, можуть бути легко визначені досвідченим фахівцем без зайвого експериментування.

Переважними ад'ювантами є анти-CD40-антитіла, іміквімод, резиквімод, GM-CSF, 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 винаходом 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 застосовуватись 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 винаходом, 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. Таки 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 строми пухлини, що несе антигенну детермінанту (наприклад, комплекс пептид-МНС відповідно до цього підходу). 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 односторонні 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, не зустрічається в природі, тобто не отриманий із пептидом 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 містить 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, IL-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 винахід 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 тримірні 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 імунотоксичності, 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 непухлинні 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. Далі, можна показати, що деякі аптамери поглинаються пухлинними клітинами і таким чином можуть використовуватися як молекулярні носії для цілеспрямованої доставки протираккових препаратів, таких як міРНК, у пухлинні клітини.

Аптамери можуть бути вибрані проти складних мішеней, таких як клітини і тканини і комплекси пептидів, що включають, переважно що складаються з послідовності відповідно до будь якої послідовності від SEQ ID NO:1 до SEQ ID NO: 114 за цим винаходом із молекулою МНС з використанням методики SELEX (Систематична еволюція лігандів шляхом експоненційного збагачення).

Пептиди за цим винаходом 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 винахід 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 клітинами ссавців нелюдського походження, отриманих методами генної інженерії, 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 винахід 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; Denker et al., 2003), які для цілей цього винаходу 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 винаходу.

Цей винахід також стосується пептиду, що містить послідовність, вибрану з групи послідовностей від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 114 або їхній варіант, який принаймні на 88 % є

гомологічним (переважно ідентичним) послідовностям від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 114 або їхнього варіанту, що викликає перехресну реакцію Т-клітин із зазначеним пептидом, де зазначений пептид не є базовим повнорозмірним поліпептидом.

5 Цей винахід також стосується пептиду, що містить послідовність, вибрану з групи послідовностей від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 114 або їхній варіант, який принаймні на 88 % є гомологічним (переважно ідентичним) послідовностям від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 114, де зазначений пептид або його варіант має загальну довжину між 8 і 100, переважно між 8 і 30 і найбільш переважно між 8 і 14 амінокислот.

10 Цей винахід також стосується пептидів за цим винаходом, які здатні зв'язуватись з молекулою головного комплексу гістосумісності (МНС) людини I або II класу.

Цей винахід також стосується пептидів за цим винаходом, де згадані пептиди складаються або по суті складаються з амінокислотної послідовності від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 114.

Цей винахід також стосується пептидів за цим винаходом, де згаданий пептид є (хімічно) модифікованим і (або) включає непептидні зв'язки.

15 Цей винахід також стосується пептидів за цим винаходом, де згаданий пептид є частиною злитого білка, зокрема злитим із N-термінальними амінокислотами HLA-DR антиген-асоційованого інваріантного ланцюга (Ii), або де пептид є злитим із антитілом (або вбудованим в антитіло), наприклад, із антитілом, що є специфічним до дендритних клітин.

20 Цей винахід також стосується нуклеїнової кислоти, що кодує пептиди за цим винаходом за умови, що пептид не є повністю (цілковито) людським білком.

Цей винахід також стосується нуклеїнової кислоти за цим винаходом, яка являє собою ДНК, кДНК, РНК, РНК чи їх комбінацію.

Цей винахід також стосується вектора експресії, що здатний експресувати нуклеїнову кислоту за цим винаходом.

25 Цей винахід також стосується пептиду за цим винаходом, нуклеїнової кислоти за цим винаходом або вектору експресії за цим винаходом для застосування в медицині, зокрема в лікуванні НКК.

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

30 Цей винахід також стосується клітини-хазяїна за цим винаходом, яка є антиген-презентуючою клітиною, і переважно дендритною клітиною.

Цей винахід також стосується способу отримання пептиду за цим винаходом, причому спосіб включає культивування клітини-хазяїна за цим винаходом і виділення пептиду зі згаданого клітини-хазяїна або її культурального середовища.

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

40 Цей винахід також стосується способу за цим винаходом, де антиген-презентуюча клітина містить вектор експресії, здатний експресувати згаданий пептид, що містить послідовність від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 114 або згаданий варіант амінокислотної послідовності.

Цей винахід також стосується активованих Т-клітин, отриманих згідно способу за цим винаходом, де згадані Т-клітини селективно розпізнають клітину, яка експресує поліпептид, що містить амінокислотну послідовність за цим винаходом.

45 Цей винахід також стосується способу знищення клітин-мішеней в організмі пацієнта, клітини-мішені якого абераантно експресують поліпептид, що містить будь-яку амінокислотну послідовність за цим винаходом, причому спосіб включає введення в організм пацієнта ефективною кількістю Т-клітин за цим винаходом.

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

55 Цей винахід також стосується застосування за цим винаходом, де лікарський засіб являє собою вакцину. Цей винахід також стосується застосування за цим винаходом, де лікарський засіб виявляє протиракову активність.

60 Цей винахід також стосується застосування за цим винаходом, де згадані ракові клітини є клітинами НКК або клітинами інших солідних або гематологічних пухлин, таких як рак легенів, рак головного мозку, рак шлунка, рак товстої або прямої кишки, рак печінки, рак підшлункової залози, рак передміхурової залози, лейкоз, рак молочної залози, меланома, рак яєчника і рак стравоходу.

Цей винахід також стосується конкретних маркерних білків і біомаркерів на основі пептидів за цим винаходом, які у цьому документі іменуватимуться як "мішені", які можуть використовуватися в діагностиці і (або) визначенні прогнозу перебігу НКК. Цей винахід 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 НКК, доставка токсину до клітини НКК, що експресує ген-маркер раку легень на підвищеному рівні, і (або) інгібування активності поліпептидного маркера НКК) відповідно до цього винаходу.

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

Наприклад, кДНК, що кодує пептид за цим винаходом, такий як пептид з послідовністю від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 114 або його варіант чи фрагмент, може експресуватися в прокаріотичних клітинах (наприклад, бактерій) або еукаріотичних клітинах (наприклад, клітинах дріжджів, комах або ссавців), після чого рекомбінантний білок можна очистити і використати для отримання препарату моноклональних або поліклональних антитіл, які специфічно зв'язують поліпептидний маркер НКК, що був використаний для отримання антитіл за цим винаходом.

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 імуноотоксинами). 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 забарвлюванням 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 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 винаходом 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 винаходом, 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 за допомогою папаїну описані у заявці WO 94/29348 і в патенті США 4 342 566. При розщепленні антитіл за допомогою папаїну, 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 винаходом можуть додатково включати гуманізовані антитіла або людські антитіла. Гуманізованими формами антитіл нелюдського походження (наприклад, мишачі) є химерні імуноглобуліни, ланцюги імуноглобулінів або їх фрагменти (такі як Fv, Fab, Fab' та інші антиген-зв'язувальні послідовності антитіл), які містять мінімальну послідовність, отриману з імуноглобуліну нелюдського походження. Гуманізовані антитіла включають імуноглобуліни людини (антитіло-реципієнт), в яких залишки від комплементарної детермінантної групи (CDR) реципієнта заміщені залишками від CDR нелюдського походження (антитіло-донор), такого як від миші, пацюка або кроля, що має бажану специфічність, афінність і зв'язувальну здатність. У деяких випадках Fv каркасні (FR) залишки імуноглобуліну 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 імуноглобуліну нелюдського походження і всі або по суті всі із ділянок FR є ділянками консенсусної послідовності імуноглобуліну людини. Оптимально, якщо гуманізоване антитіло містить також принаймні частину константної ділянки імуноглобуліну (Fc), зазвичай ділянку імуноглобуліну 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, яке є 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 виробки ендогенного імуноглобуліну. 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 виробки ендогенних антитіл. Перенесення генної матриці імуноглобуліну клітин зародків людини у лінію клітин зародків мутантних мишей приводить до виробки людських антитіл після антигенної стимуляції. Людські антитіла можуть також бути виділені методом фагового дисплея з комбінаторної бібліотеки.

Антитіла за винаходом 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. pH 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 щоденна доза при застосуванні антитіл як монотерапії може становити від приблизно 1 мкг/кг до 100 мкг/кг маси тіла або більше на добу, залежно від вищезгаданих факторів. Після введення антитіл, переважно з метою лікування НКК, 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 винахід 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 комплементарні детермінантні групи. 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 застосування як лікарського препарату альфа- і бета-ланцюги можуть буди зв'язані, наприклад ненативними дисульфідними зв'язками або 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. Більш того, він може експресуватися у Т-клітинах, що використовуються для адаптивного переносу. Додаткову інформацію можна знайти у заявках WO 2004/033685A1 і WO 2004/074322A1. Комбінація pTKR описана у заявці WO 2012/056407A1. Інші способи отримання розкриті у заявці WO 2013/057586A1.

У ще одному аспекті цей винахід стосується ТКР, наприклад, розчинного Т-клітинного рецептора (pTKR), що розпізнає конкретний комплекс пептиду і МНС, як це розкрито тут.

Крім того, пептиди і (або) ТКР, або антитіла, або інші зв'язувальні молекули за цим винаходом 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 $1 \times 10^{-6}\text{M}$.

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*.

Згідно з іншим аспектом цього винаходу пропонується спосіб отримання активованих Т-клітин *in vitro*, причому спосіб включає контактування *in vitro* Т-клітин із навантаженими антигеном молекулами МНС, що експресуються на поверхні відповідної антиген-презентуючої клітини протягом періоду часу, достатнього для активації Т-клітини шляхом набуття нею специфічності до антигену, де згаданий антиген є пептидом за винаходом. Переважно з антиген-презентуючою клітиною використовують достатню кількість антигену.

Переважно клітина-савців не має пептидного транспортера ТАР чи має його знижений рівень або знижену функціональну активність. Відповідні клітини з дефіцитом пептидного транспортера ТАР включають клітини Т2, RMA-S і клітини дрогофіли. ТАР є транспортером, асоційованим із процесингом антигену.

Лінія людських клітин з недостатністю Т2, на які завантажуються пептиди, доступна для придбання у Американській колекції типових культур ATCC за адресою 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, США, номер за каталогом CRL 1992; лінія клітин дрогофіли Schneider 2 доступна для придбання в ATCC, номер за каталогом CRL 19863; клітинна лінія миші RMA-S описана у Ljunggren і співавт. (Ljunggren and Karre, 1985).

Переважно, клітина-хазяїн до трансфекції не експресує суттєвої кількості молекул МНС I класу. Також переважно клітина-стимулятор експресує молекулу, яка є важливою для забезпечення додаткового стимулюючого сигналу для Т-клітин, таку як будь-яка з молекул B7.1, B7.2, ICAM-1 і LFA 3. Послідовності нуклеїнових кислот багатьох молекул МНС I класу і костимуляторних молекул є у вільному доступі в базах даних GenBank і EMBL.

У випадку, коли роль антигенів відіграють епітопи комплексу МНС I класу, Т-клітини є CD8-позитивними Т-клітинами.

Якщо антиген-презентуюча клітина трансфекують для експресії такого епітопу, клітина переважно містить вектор експресії, здатний експресувати пептид, що містить послідовності від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 114 і (або) SEQ ID NO: 115 до SEQ ID NO: 151, або варіант його амінокислотної послідовності.

Ряд інших способів може використовуватися для отримання Т-клітин *in vitro*. Наприклад, для отримання ЦТЛ можуть використовуватися аутологічні лімфоцити, які інфільтрують пухлину. Plebanski і співавт. (Plebanski et al., 1995) використовували аутологічні лімфоцити периферійної крові (PLB) для отримання Т-клітин. Більш того, можливе створення аутологічних Т-клітин шляхом обробки дендритних клітин пептидом або поліпептидом або інфікуванням рекомбінантним вірусом. Для отримання аутологічних Т-клітин можуть також використовуватися В-клітини. Крім того, для отримання аутологічних Т-клітин можуть використовуватися макрофаги, оброблені пептидом або поліпептидом або інфіковані рекомбінантним вірусом. S. Walter і співавт. (Walter et al., 2003) описують примування Т-клітин *in vitro* за допомогою штучних антиген-презентуючих клітин (штучні АПК), що також є прийнятним способом отримання Т-клітин проти вибраного пептиду. В цьому винаході штучні АПК отримували шляхом прикріплення заздалегідь сформованих комплексів МНС-пептид до поверхні полістирольних частинок (мікрогранул) за допомогою системи біотин-стрептавідин. Ця система забезпечує точний контроль щільності МНС на штучних АПК, що дозволяє селективно викликати високо- або низькоавідні специфічні до антигену відповіді Т-клітин з високою ефективністю для зразків крові. Окрім комплексів МНС-пептид, штучні АПК мають нести інші білки з костимулювальною активністю, такі як антитіла проти CD28, прикріплені до їхньої поверхні. До того ж такі системи на базі штучних АПК часто вимагають додавання відповідних розчинних елементів, наприклад, цитокінів, таких як інтерлейкін-12.

Алогенні клітини також можуть використовуватися для отримання Т-клітин, і відповідний спосіб докладно описаний у заявці WO 97/26328, яка включена в цей документ шляхом посилання. Наприклад, окрім клітин *Drosophila* і клітин Т2, інші клітини можуть використовуватися для презентації антигенів, такі як клітини СНО, інфіковані бациловірусом клітин комах, бактеріальні, дріжджові клітини та клітини-мішені, інфіковані коров'ячою віспою. Крім того, можуть використовуватись віруси рослин (див., наприклад, роботу Porta і співавт. (Porta et al., 1994), в якій описується розробка мозаїчного вірусу вігні як високопродуктивної системи для презентації чужорідних пептидів.

Активовані Т-лімфоцити, які спрямовані проти пептидів за винаходом, є корисними в терапії. Отже, згідно з ще одним аспектом винаходу пропонуються активовані Т-клітини, які можна отримати за допомогою вищезгаданих способів за винаходом.

Активовані Т-клітини, які отримані вищезгаданим способом, селективно розпізнають клітину, яка аберантно експресує поліпептид, який містить амінокислотну послідовність від SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 114.

Переважно, Т-клітина розпізнає цю клітину шляхом взаємодії свого Т-клітинного рецептора з комплексом HLA/пептид (наприклад, зв'язуванням). Т-клітини є корисними у способі знищення клітин-мішеней в організмі пацієнта, клітини-мішені якого аберантно експресують поліпептид, що містить амінокислотну послідовність за винаходом, за яким пацієнту вводиться ефективна кількість активованих Т-клітин. Ці Т-клітини, що вводяться пацієнту, можуть бути виділені з організму пацієнта і активовані як описано вище (тобто вони є аутологічними Т-клітинами). Як альтернатива, ці Т-клітини одержуються не з організму пацієнта, а від іншої людини. Зрозуміло, що переважно ця людина є здоровою людиною. Під терміном "здорова людина" автори винаходу мають на увазі, що людина має хороший загальний стан здоров'я, переважно має адекватну імунну систему та, ще більш переважно, не страждає від якогось захворювання, на яке її можна легко перевірити і виявити.

In vivo, клітини-мішені для CD8-позитивних Т клітин за цим винаходом можуть бути клітинами пухлини (які іноді експресують МНС II класу) і (або) клітинами стромы, що оточують пухлину (пухлинні клітини) (які іноді також експресують МНС II класу; (Dengjel et al., 2006)).

Т-клітини за цим винаходом можуть використовуватися як активні інгредієнти терапевтичної композиції. Отже, предметом цього винаходу також є спосіб знищення клітин-мішеней в організмі пацієнта, клітини-мішені якого аберантно експресують поліпептид, що містить амінокислотну послідовність за винаходом, причому спосіб включає введення пацієнту ефективною кількістю Т-клітин згідно визначеному вище.

Під терміном "аберадно експресовані" автори винаходу мають на увазі, що поліпептид є надмірно експресованим у порівнянні з нормальними рівнями експресії або що ген є "мовчазним" у тканині, з якої походить пухлина, але він експресується в пухлині. Під терміном "надмірно експресований" автори винаходу мають на увазі, що поліпептид присутній на рівні, що принаймні у 1,2 рази вищий за рівень у нормальній тканині, переважно принаймні у 2 рази, та більш переважно принаймні у 5 або 10 разів вищий за рівень у нормальній тканині.

Т-клітини можуть бути отримані способами, що відомі в галузі, наприклад, тими, що описані вище. Протоколи для цього так званого адаптивного перенесення Т-клітин також добре відомі в цій галузі. Огляди можна знайти, наприклад, у роботах Gattioni і співавт. і Morgan і співавт. (Gattioni et al., 2006; Morgan et al., 2006).

У ще одному аспекті цей винахід стосується застосування пептидів, які входять до складу комплексу з МНС, для отримання Т-клітинного рецептора, нуклеїнова кислота якого клонована і введена у клітину-хазяїн, переважно Т-клітину. Ця отримана методами генної інженерії Т-клітина може потім бути перенесена в організм пацієнта для лікування раку.

Будь-яка молекула за винаходом, тобто пептид, нуклеїнова кислота, антитіло, вектор експресії, клітина, активована Т-клітина, Т-клітинний рецептор або нуклеїнова кислота, яка її кодує, є прийнятною для лікування захворювань, для яких є характерним те, що клітини уникають імунної відповіді. Таким чином, будь-яка молекула за цим винаходом може застосовуватися як лікарський засіб або в процесі виробництва лікарського засобу. Згадана молекула може використовуватися сама по собі або у комбінації з іншою молекулою (іншими молекулами) за винаходом або відомою молекулою (відомими молекулами).

За цим винаходом також пропонується комплект, що включає:

(а) контейнер, який містить фармацевтичну композицію як зазначено вище, у розчині або у ліофілізованій формі;

(б) необов'язково, другий контейнер, що містить розріджувач або розчин для відновлення ліофілізованої композиції, і

(в) необов'язково, інструкції із (i) застосування розчину або (ii) відновлення і (або) застосування ліофілізованої композиції.

Комплект може додатково включати один або більше (iii) буферів, (iv) розріджувачів, (v) фільтрів, (vi) голок або (vii) шприців. Контейнер є переважно пляшкою, флаконом, шприцом або пробіркою; і він може бути контейнером багаторазового застосування. Фармацевтична композиція є переважно ліофілізованою.

Комплекти за винаходом, переважно, включають ліофілізовану композицію за цим винаходом в належному контейнері та інструкції з її відновлення і (або) застосування. Належні контейнери включають, наприклад, пляшки, флакони (наприклад, двокамерні флакони), шприци

(такі як двокамерні шприци) і пробірки. Контейнер може бути виготовленим із багатьох видів матеріалів, таких як скло або пластмаса. Переважно, комплект і (або) контейнер містить(ять) інструкції із застосування контейнера або пов'язані з контейнером, які містять вказівки щодо відновлення і (або) застосування. Наприклад, на етикетці може вказуватися, що ліофілізована

5 лікарська форма має бути відновлена до таких концентрацій пептидів як зазначено вище. На етикетці, крім того, може бути зазначено, що лікарська форма є прийнятною для або призначена для підшкірного введення.

Контейнер із лікарською формою може бути флаконом багаторазового застосування, котрий дозволяє робити повторні введення (наприклад, від 2 до 6 введень) відновленої лікарської

10 форми. Комплект додатково може включати другий контейнер, що містить прийнятний розріджувач (наприклад, розчин бікарбонату натрію).

Після змішування розріджувача та ліофілізованої форми остаточна концентрація пептиду у відновленій формі переважно становить принаймні 0,15 мг/мл/пептиду (=75 мкг) та переважно не більше 3 мг/мл/пептиду (=1500 мкг). Комплект додатково може включати інші матеріали,

15 бажані з комерційної точки зору та з точки зору користувача, включаючи інші буфери, розріджувачі, фільтри, голки, шприци та вкладиші в упаковку з інструкціями із застосування.

Комплекти за цим винаходом можуть включати один контейнер, який містить лікарську форму фармацевтичних композицій відповідно до цього винаходу з іншими компонентами чи без них (наприклад, інші сполуки або фармацевтичні композиції цих інших сполук) чи включати

20 окремі контейнери для кожного компоненту.

Переважно, комплекти за винаходом включають композицію за винаходом, упаковану для використання, в комбінації з одночасним введенням другої сполуки, такої, як ад'юванти (наприклад, ГМ-КСФ), хіміотерапевтичний агент, природний продукт, гормон чи антагоніст, анти-ангіогенезний агент чи інгібітор, апоптоз-індукуючий агент або хелатор) чи їхню фармацевтичну

25 композицію. Компоненти комплекту до введення пацієнту можуть бути завчасно змішані, чи кожний компонент може бути в окремому контейнері. Компоненти комплекту можуть бути надані в одному чи кількох рідких розчинах, переважно, водному розчині, більш переважно, стерильному водному розчині. Компоненти комплекту також можуть надаватися як речовини у твердому стані, які можуть бути переведені на рідини шляхом додання прийнятних розчинників,

30 котрі переважно містяться в іншому окремому контейнері.

Контейнер терапевтичного комплекту може являти собою флакон, пробірку, колбу, пляшку, шприц або будь-який інший засіб для вміщення твердої речовини чи рідини. Зазвичай, коли є більш ніж один компонент, комплект включає другий флакон чи другий контейнер, який дозволяє окреме дозування. Комплект може також включати інший контейнер для

35 фармацевтично прийнятної рідини. Переважно, терапевтичний комплект буде включати апарат (наприклад, одну чи кілька голок, шприци, очні піпетки, піпетку та ін.), який робить можливим введення речовин відповідно винаходу, що є компонентами цього комплекту.

Ця лікарська форма є формою, прийнятною для введення пептидів будь-яким зручним способом, наприклад, пероральним (ентеральним), назальним, очним, підшкірним,

40 внутрішньошкірним, внутрішньом'язовим, внутрішньовенним або трансдермальним. Переважно, введення може здійснюватися підшкірно, та найбільш переважно, внутрішньошкірно інфузійним насосом.

Оскільки пептиди за винаходом були виділені з тканин НКК, лікарський засіб за винаходом переважно застосовується для лікування НКК.

Цей винахід також стосується способу отримання персоналізованого фармацевтичного засобу для застосування для конкретного пацієнта, який включає виготовлення фармацевтичної композиції, яка містить принаймні один пептид, вибраний із "сховища" заздалегідь "просіяних" TUMAP, в якому щонайменше один пептид, використаний у

50 фармацевтичній композиції, вибраний таким чином, щоб підходити конкретному пацієнту. В одному з втілень фармацевтична композиція є вакциною. Спосіб може також бути пристосованим для отримання клонів Т-клітин для подальшого використання, такого як виділення ТКР, або розчинних антитіл та інших варіантів лікування.

"Персоналізований фармацевтичний засіб" означає засоби лікування, спеціально адаптовані для конкретного пацієнта, які будуть застосовані для лікування лише цього конкретного пацієнта, включаючи активно персоналізовані протиракові вакцини і засоби

55 адоптивної клітинної терапії з використанням аутологічних тканин, отриманих від пацієнта.

Термін "сховище" в контексті цього винаходу означає групу пептидів, яка заздалегідь пройшла "просіяння" (скринінг) на імуногенність і (або) надмірну презентацію у конкретному виді пухлин. Термін "сховище" не означає, що конкретні пептиди, що входять до складу вакцини,

60 були заздалегідь виготовлені і зберігалися у фізичному об'єкті, хоча така можливість мається на

увазі. Прямо передбачається, що пептиди можуть бути виготовлені *de novo* для кожної отриманої персоналізованої вакцини або вони можуть бути виготовлені заздалегідь і зберігатися. "Сховище" (наприклад, у формі бази даних) складається з пухлино-асоційованих пептидів, що були високо експресовані тканинами пухлин хворих на НКК пацієнтів із різними алелями HLA-A, HLA-B і HLA-C. Воно може містити пептиди, що зв'язані з молекулами МНС I класу і з молекулами МНС II класу або подовжені пептиди, що зв'язані з молекулами МНС I класу. На додаток до пухлино-асоційованих пептидів, отриманих із декількох тканин НКК, сховище може містити маркерні пептиди, що зв'язані з HLA-A*02 і HLA-A*24. Ці пептиди дозволяють кількісно порівняти інтенсивність Т-клітинної відповіді, індукованої TUMAP, і таким чином дозволяє зробити важливий висновок відносно здатності вакцини викликати протипухлинну відповідь. По-друге, вони виконують функцію важливих пептидів позитивного контролю, отриманих з "не свого" антигену, у випадку, якщо у пацієнта не спостерігаються жодні вакцино-індуковані Т-клітинні відповіді на TUMAP, отримані зі "своїх" власних антигенів пацієнта. І по-третє, воно дозволяє зробити висновки щодо стану імункомпетентності пацієнта.

TUMAP для "сховища" ідентифікуються за допомогою підходу інтегрованої функціональної геноміки, що поєднує аналіз генної експресії, мас-спектрометрію і Т-клітинну імунологію (XPresident®). Цей підхід гарантує, що тільки TUMAP, насправді присутні у великому відсотку пухлин, але не взагалі неекспресовані або лише мінімально експресовані на нормальних тканинах, будуть вибрані для подальшого аналізу. Для первинного вибору пептидів зразки НКК пацієнтів і зразки крові від здорових донорів аналізували з використанням поетапного підходу:

1. HLA-ліганди зі зл�якісного матеріалу ідентифікували методом мас-спектрометрії.

2. Аналіз експресії інформаційної рибонуклеїнової кислоти (іРНК) в усьому геномі використовували для ідентифікації генів, що надмірно експресовані у зл�якісній тканині (НКК) у порівнянні з рядом нормальних органів і тканин.

3. Ідентифіковані HLA-ліганди порівнювали з даними генної експресії Пептиди, надмірно або селективно презентовані на пухлінній тканині, переважно такі, що кодуються селективно експресованими або надмірно-експресованими генами, як було визначено на етапі 2, вважали прийнятними TUMAP-кандидатами для включення до складу мультипептидної вакцини.

4. Пошук літератури був проведений для ідентифікації додаткових свідцтв, що підтверджують доречність використання ідентифікованих пептидів як TUMAP.

5. Доречність надмірної експресії на рівні іРНК була підтверджена повторним виявленням вибраних TUMAP етапу 3 на пухлинній тканині і їх відсутністю (або рідким виявленням) на здорових тканинах.

6. Для оцінки того, чи є здійсненою індукція вибраними пептидами Т-клітинної відповіді *in vivo*, був проведений аналіз імуногенності *in vitro* з використанням Т-клітин людини, отриманих від здорових донорів, а також від пацієнтів, хворих на НКК.

В одному з аспектів пептиди проходять попередній скринінг на імуногенність перед тим, як їх включати до "сховища". Як приклад, що не має обмежувального значення, імуногенність пептидів, доданих до "сховища", визначають методом, що включає примування Т-клітин *in vitro* шляхом повторних стимуляцій CD8+Т-клітин від здорових донорів клітинами, що презентують штучний антиген, навантаженими комплексами пептид/МНС і антитілами проти CD28.

Цей метод є переважним для видів раку, що рідко спостерігаються, і для пацієнтів з рідкісними профілями експресії. На відміну від мультипептидних коктейлів зі сталим складом, які у даний час вже розроблені, "сховище" дозволяє забезпечити значно кращий збіг з вакциною реальної експресії антигенів у пухлині. Вибрані "готові для застосування" індивідуальні пептиди або комбінації декількох пептидів будуть використані для кожного пацієнта у багатоцільовому підході. Теоретично, підхід, який базується на виборі, наприклад, 5 різних антигенних пептидів із бібліотеки з 50 пептидів, вже мав би привести приблизно до 17 мільйонів можливих складів лікарських препаратів.

В одному варіанті винаходу пептиди вибираються для включення до складу вакцини на основі їхньої прийнятності для конкретного пацієнта на основі способу за цим винаходом як вже описано в цьому документі або як викладено нижче.

З матеріалу пухлини і зразків крові пацієнта будуть зібрані дані щодо фенотипу HLA, транскриптомного і пептидомного аналізу з метою ідентифікувати найбільш прийнятні для кожного пацієнта пептиди "сховища" і унікальні для пацієнта (тобто мутовані) TUMAP. Будуть вибрані ті пептиди, які селективно або надмірно експресуються в пухлинах пацієнтів і, де можливо, демонструють сильну імуногенність *in vitro*, якщо вони були досліджені на зразках МКПК індивідуальних пацієнтів.

Переважно, пептиди, що входять до складу вакцини, ідентифіковані методом, що включає:

- (a) ідентифікацію пухлино-асоційованих пептидів (TUMAP), які презентуються зразком пухлини

від конкретного пацієнта; (б) порівняння пептидів, ідентифікованих в (а), зі сховищем (базою даних) пептидів як зазначено вище; і (в) вибір принаймні одного пептиду зі сховища (базу даних), який корелює з пухлино-асоційованим пептидом, ідентифікованим у пацієнта. Наприклад, TUMAP, які презентуються зразком пухлини, ідентифікуються за допомогою: (а1) порівняння даних експресії зі зразка пухлини з даними експресії зі зразка нормальної тканини, що відповідає типу тканини зразка пухлини, для ідентифікації білків, які надмірно експресуються або аберантно експресуються у зразку пухлини; і (а2) проведення кореляції даних експресії з послідовностями лігандів МНС, зв'язаних із молекулою МНС I класу і (або) II класу, в зразку пухлини для ідентифікації лігандів МНС, отриманих із білків, що надмірно експресуються або аберантно експресуються пухлиною. Переважно, послідовності лігандів МНС ідентифікуються елюванням зв'язаних пептидів із їхніх комплексів із молекулами МНС, виділених із зразка пухлини, і секвенуванням елюованих лігандів. Переважно, зразок пухлини і нормальна тканина отримані від того самого пацієнта.

На додаток до (або як альтернатива йому) вибору пептидів з використанням моделі "сховища", TUMAP можуть бути ідентифіковані у пацієнта *de novo* і потім введені до складу вакцини. Як один приклад, TUMAP-кандидати можуть бути ідентифіковані у пацієнта шляхом (а1) порівняння даних експресії зі зразка пухлини з даними експресії зі зразка нормальної тканини, що відповідає типу тканини зразка пухлини, для ідентифікації білків, які надмірно експресуються або аберантно експресуються у зразку пухлини; і (а2) проведення кореляції даних експресії з послідовностями лігандів МНС, зв'язаних із молекулою МНС I класу і (або) II класу, в зразку пухлини для ідентифікації лігандів МНС, отриманих із білків, що надмірно експресуються або аберантно експресуються пухлиною. Як інший приклад, білки можуть бути ідентифіковані як такі, що містять мутації, які є унікальними для зразка пухлини, по відношенню до відповідної нормальної тканини конкретного пацієнта, а TUMAP можуть бути ідентифіковані як такі, що специфічно націлені на цю мутацію. Наприклад, геном пухлинної клітини і геном клітин відповідної нормальної тканини можливо секвенувати методом повногеномного секвенування: для викриття несинонімічних мутацій у білок-кодуючій ділянці генів геномні ДНК і РНК екстрагують із пухлинних тканин, а нормальну немутовану геномну ДНК лінії зародкових клітин екстрагували з мононуклеарних клітин периферичної крові (МКПК). Використаний метод секвенування нового покоління (NGS) зводиться до повторного секвенування білок-кодуючих ділянок (ресеквенування екзому). З цією метою екзонну ДНК із зразків людини уловлюють за допомогою комплексів збагачення цільовими фрагментами, придбаних у постачальника, з наступним секвенуванням, наприклад, за допомогою HiSeq2000 (Illumina). Крім цього, іРНК пухлинних клітин секвенують для прямого кількісного визначення генної експресії і підтвердження того, що мутовані гени експресуються у пухлинах пацієнтів. Отримані мутації послідовностей зчитування обробляють з використанням програмно-реалізованих алгоритмів. Таблиця результатів містить мутації і показники генної експресії. Пухлиноспецифічні соматичні мутації визначають шляхом порівняння з варіаціями зародкових ліній, що походять від МКПК, і розміщують у відповідності до пріоритету. Ідентифіковані *de novo* пептиди можуть згодом бути досліджені на імуногенність як викладено вище для "сховища", а і TUMAP-кандидати, що мають прийнятну імуногенність, вибирають для включення до складу вакцини.

В одному з прикладів втілень пептиди, що входять до складу вакцини, ідентифікуються таким чином: (а) ідентифікацією пухлино-асоційованих пептидів (TUMAP), які презентуються зразком пухлини від конкретного пацієнта описаними вище методами; (б) порівнянням пептидів, ідентифікованих в а), зі сховищем пептидів, які пройшли попередній скринінг на імуногенність і на надмірну експресію у пухлинах у порівнянні з відповідною нормальною тканиною; (в) вибором принаймні одного пептиду зі сховища, який корелює з пухлино-асоційованим пептидом, ідентифікованим у пацієнта, і г) необов'язково, вибором принаймні одного пептиду, ідентифікованого *de novo* в (а) і підтвердженням його імуногенності.

В одному з прикладів втілень пептиди, що входять до складу вакцини, ідентифікуються таким чином: (а) ідентифікацією пухлино-асоційованих пептидів (TUMAP), які презентуються зразком пухлини від конкретного пацієнта; і (б) вибором принаймні одного пептиду, ідентифікованого *de novo* в (а) і підтвердженням його імуногенності.

Після вибору пептидів для персоналізованої вакцини на основі пептиди виготовляється вакцина. Ця вакцина переважно є рідкою лікарською формою, що складається з окремих пептидів, розчинених у ДМСО концентрацією від 20 до 40 %, переважно приблизно від 30 до 35 %, такий як приблизно 33 % ДМСО.

Кожен пептид, який належить включити до композиції, розчиняють у ДМСО. Концентрацію розчинів окремих пептидів необхідно вибирати залежно від кількості пептидів, які належить включити до складу продукту. Розчини окремих пептидів у ДМСО змішують у рівних частинах,

щоб отримати розчин, який містить усі пептиди, які належить включити до складу продукту, з концентрацією ~2,5 мг/мл для кожного пептиду. Змішаний розчин потім розводять у співвідношенні 1:3 водою для ін'єкцій з метою досягти концентрацію 0,826 мг/мл для кожного пептиду у 33 % ДМСО. Розведений розчин фільтрують через стерильний фільтр із розміром пор 0,22 мкм. Отримують нерозфасований кінцевий розчин.

Нерозфасований кінцевий розчин розливають по флаконах і зберігають при температурі -20 °C аж до використання. Один флакон вміщує 700 мкл розчину, що містить 0,578 мг кожного пептиду. 500 мкл цього розчину (приблизно 400 мкг кожного пептиду) будуть використані для внутрішньошкірної ін'єкції.

На додаток до можливості використання для лікування раку, пептиди за цим винаходом можуть також використовуватися як діагностичні реактиви. Оскільки пептиди генерувалися з клітин НКК і оскільки було визначено, що ці пептиди не є присутніми у нормальних тканинах або присутні у низькій кількості, ці пептиди можуть використовуватися для діагностики наявності раку.

Присутність пептидів за цим винаходом на біоптатах тканин у зразках крові може допомогти патоморфологу в діагностуванні раку. Виявлення певних пептидів за допомогою антитіл, мас-спектрометрії або інших методів, відомих фахівцям у цій галузі, може надати патоморфологу інформацію, чи є тканина злоякісною або запаленою або взагалі ураженою хворобою, або може використовуватися як біомаркер НКК. Наявність груп пептидів може дозволити віднести хворі тканини до певного класу чи підкласу.

Виявлення пептидів на зразках хворої тканини дає можливість прийняти рішення відносно користі від методів лікування за участю імунної системи, особливо якщо відомо або передбачається, що Т-лімфоцити причетні до механізму дії. Втрата експресії МНС є добре відомим механізмом, за яким інфіковані або злоякісні клітини уникають імунного контролю. Отже, наявність пептидів свідчить про те, що цей механізм не використовується клітинами, що аналізуються.

Пептиди за цим винаходом можливо використовувати для аналізу відповіді лімфоцитів на дію таких пептидів, такої як реакція Т-клітин або відповідь антитіл на пептид або комплекс пептиду і молекул МНС. Ці відповіді лімфоцитів можливо використовувати як прогностичні маркери для прийняття рішень щодо наступних терапевтичних дій. Ці відповіді можна також використовувати як сурогатні маркери в імунотерапевтичних підходах, що мають на меті викликати відповіді лімфоцитів у різний спосіб, наприклад, вакцинацією білками, нуклеїновими кислотами, аутологічними матеріалами, адоптивним перенесенням лімфоцитів. В закладах, де застосовують генну терапію, для оцінки побічних ефектів рекомендується проаналізувати реакції лімфоцитів на пептиди. Моніторинг реакцій лімфоцитів може також бути цінним інструментом під час обстеження при подальшому спостереженні після трансплантації, наприклад, для виявлення реакцій "трансплантат проти хазяїна" та "хазяїн проти трансплантата".

Цей винахід буде проілюстрований наведеними нижче прикладами, які описують його переважні втілення, з посиланнями на супроводжувальні фігури, але не обмежуються наведеними тут. Для цілей цього винаходу всі цитовані джерела включені в цей документ шляхом посилання в усій повноті.

ФІГУРИ

На Фігурах 1A-N показана надмірна презентація різних пептидів на нормальних тканинах і на зразках НКК. Фігура 1A) Ген: SLC17A3, Пептид: ALIVSLPYL (SEQ ID NO.: 1) - тканини зліва направо: 1 жирова тканина, 3 надниркові залози, 2 артерії, 3 кісткових мозки, 7 головних мозків, 3 молочні залози, 13 товстих кишок, 1 яєчник, 1 дванадцятипала кишка, 4 стравоходи, 2 жовчних міхури, 3 серця, 4 зразки лейкоцитів, 19 печінок, 43 легені, 1 лімфатичний вузол, 1 яєчник, 6 підшлункових залоз, 2 периферичних нерви, 1 очеревина, 1 гіпофіз, 3 плеври, 1 передміхурова залоза, 6 прямих кишок, 3 скелетні м'язи, 3 шкіри, 2 тонкі кишки, 4 селезінки, 5 шлунків, 1 сім'яник, 2 тимуси, 3 щитоподібні залози, 2 матки, 2 вени, 12 нирок, 18 НКК. Цей пептид був також виявлений на зразках раку печінки (не показано). Фігура 1B) Ген: SOGA2, пептид: YLEEDVYQL (SEQ ID NO.: 128) - тканини зліва направо: 1 жирова тканина, 3 надниркові залози, 2 артерії, 3 кісткових мозки, 7 головних мозків, 3 молочні залози, 13 товстих кишок, 1 яєчник, 1 дванадцятипала кишка, 4 стравоходи, 2 жовчних міхури, 3 серця, 4 зразки лейкоцитів, 19 печінок, 43 легені, 1 лімфатичний вузол, 1 яєчник, 6 підшлункових залоз, 2 периферичних нерви, 1 очеревина, 1 гіпофіз, 3 плеври, 1 передміхурова залоза, 6 прямих кишок, 3 скелетні м'язи, 3 шкіри, 2 тонкі кишки, 4 селезінки, 5 шлунків, 1 сім'яник, 2 тимуси, 3 щитоподібні залози, 2 матки, 2 вени, 12 нирок, 18 НКК. Цей пептид був також виявлений на зразках раку підшлункової залози, раку яєчника, раку шлунка і раку легенів (не показані). Фігура 1C) Ген:

SEMA5B, пептид: ALDPSGNQLI (SEQ ID NO.: 12) - тканини зліва направо: 1 жирова тканина, 3 надниркові залози, 2 артерії, 3 кісткових мозки, 7 головних мозків, 3 молочні залози, 13 товстих кишок, 1 яєчник, 1 дванадцятипала кишка, 4 стравоходи, 2 жовчних міхури, 3 серця, 4 зразки лейкоцитів, 19 печінок, 43 легені, 1 лімфатичний вузол, 1 яєчник, 6 підшлункових залоз, 2 периферичних нерви, 1 очеревина, 1 гіпофіз, 3 плеври, 1 передміхурова залоза, 6 прямих кишок, 3 скелетні м'язи, 3 шкіри, 2 тонкі кишки, 4 селезінки, 5 шлунків, 1 сім'яник, 2 тимуси, 3 щитоподібні залози, 2 матки, 2 вени, 12 нирок, 18 НКК. Цей пептид був також виявлений на зразках раку яєчника, раку головного мозку і раку легенів (не показані). Фігура 1D) Ген: RGS5, пептид: GLASFKSFL (SEQ ID NO.: 8) - тканини зліва направо: 1 жирова тканина, 3 надниркові залози, 2 артерії, 3 кісткових мозки, 7 головних мозків, 3 молочні залози, 13 товстих кишок, 1 яєчник, 1 дванадцятипала кишка, 4 стравоходи, 2 жовчних міхури, 3 серця, 4 зразки лейкоцитів, 19 печінок, 43 легені, 1 лімфатичний вузол, 1 яєчник, 6 підшлункових залоз, 2 периферичних нерви, 1 очеревина, 1 гіпофіз, 3 плеври, 1 передміхурова залоза, 6 прямих кишок, 3 скелетні м'язи, 3 шкіри, 2 тонкі кишки, 4 селезінки, 5 шлунків, 1 сім'яник, 2 тимуси, 3 щитоподібні залози, 2 матки, 2 вени, 12 нирок, 18 НКК. Цей пептид був також виявлений на зразках раку передміхурової залози, раку молочної залози, раку товстої кишки, раку печінки, меланоми, раку яєчника, раку стравоходу, раку підшлункової залози, раку головного мозку, раку шлунка і раку легенів (не показані). Фігура 1E) Ген: SLC16A3, пептид: VVDEGPTGV (SEQ ID NO.: 135) - тканини зліва направо: 1 клітинна лінія лейкоцитів, 5 нормальних тканин (3 легені, 1 лімфатичний вузол, 1 селезінка), 77 ракових тканин (2 раки головного мозку, 1 рак молочної залози, 1 рак товстої кишки, 1 рак стравоходу, 10 раків нирки, 1 лейкоз, 1 рак печінки, 35 раків легенів, 12 раків яєчника, 8 раків підшлункової залози, 5 раків шлунка). Зразки без презентації пептидів не показані. Панель досліджених нормальних (здорових) тканин була така сама, як на Фігурах 1A–D. Фігура 1F) Ген: ESM1, пептид: LLVPAHLVAA (SEQ ID No.: 25) - тканини зліва направо: 1 жирова тканина, 3 надниркові залози, 2 артерії, 3 кісткових мозки, 7 головних мозків, 3 молочні залози, 13 товстих кишок, 1 дванадцятипала кишка, 4 стравоходи, 2 жовчних міхури, 3 серця, 4 зразки лейкоцитів, 19 печінок, 43 легені, 1 лімфатичний вузол, 1 яєчник, 6 підшлункових залоз, 2 периферичних нерви, 1 очеревина, 1 гіпофіз, 3 плеври, 1 передміхурова залоза, 6 прямих кишок, 3 скелетні м'язи, 3 шкіри, 2 тонкі кишки, 4 селезінки, 5 шлунків, 1 сім'яник, 2 тимуси, 3 щитоподібні залози, 2 матки, 2 вени, 12 нирок, 18 НКК. Цей пептид був також виявлений на зразках раку підшлункової залози, раку стравоходу, раку головного мозку, раку легенів і раку матки (не показані). Фігура 1G) Ген: ARHGAP42, Пептид: ILIKHLVKV (SEQ ID NO.: 15) - тканини зліва направо: 1 клітинна лінія (1 меланома), 17 ракових тканин (1 рак товстої кишки, 5 раків нирки, 1 рак печінки, 3 раки легенів, 4 раки лімфатичних вузлів, 1 рак яєчка, 2 раки матки). Фігура 1H) Ген: HTR, пептид: FIADVVEKI (SEQ ID NO.: 33) - тканини зліва направо: 16 ракових тканин (1 рак головного мозку, 1 рак молочної залози, 1 рак стравоходу, 3 раки нирки, 1 рак лейкоцитів, 5 раків легенів, 1 рак лімфатичних вузлів, 2 раки яєчника, 1 рак підшлункової залози). Фігура 1I) Ген: HSF2B, пептид: VLLDTILQL (SEQ ID NO.: 38) - тканини зліва направо: 1 доброякісна пухлина (рак нирки), 3 клітинні лінії (1 підшлункова залоза, 1 плевра, 1 передміхурова залоза), 1 інше захворювання (1 шкіра), 9 нормальних тканин (1 легеня, 1 лімфатичний вузол, 2 плаценти, 1 тонка кишка, 3 селезінки, 1 щитоподібна залоза), 67 ракових тканин (1 рак жовчних протоків, 5 раків головного мозку, 2 раки молочної залози, 2 раки стравоходу, 2 раки жовчного міхура, 4 раки нирки, 7 раків лейкоцитів, 3 раки печінки, 16 раків легенів, 5 раків лімфатичних вузлів, 1 рак мієлоїдних клітин, 9 раків яєчника, 1 рак підшлункової залози, 1 рак прямої кишки, 5 раків шкіри, 2 раки сечового міхура, 1 рак матки). Фігура 1J) Ген: TRAM1, пептид: YLLNLNHLGL (SEQ ID NO.: 39) - тканини зліва направо: 2 клітинні лінії (1 нирка, 1 підшлункова залоза), 1 нормальна тканина (1 легеня), 19 ракових тканин (1 рак молочної залози, 2 раки нирки, 3 раки лейкоцитів, 2 раки печінки, 7 раків легенів, 1 рак лімфатичних вузлів, 1 рак яєчника, 1 рак прямої кишки, 1 рак сечового міхура). Фігура 1K) Ген: PXDNL, пептид: SILDAVQRV (SEQ ID NO.: 52) - тканини зліва направо: 23 ракових тканин (3 раки головного мозку, 4 раки молочної залози, 3 раки нирки, 8 раків легенів, 2 раки яєчника, 1 рак підшлункової залози, 1 рак шкіри, 1 рак матки). Фігура 1L) Ген: THY1, пептид: SLLQATDFMSL (SEQ ID NO.: 82) - тканини зліва направо: 11 клітинних ліній (11 ліній клітин підшлункової залози), 4 нормальні тканини (1 нирка, 1 лімфатичний вузол, 1 плацента, 1 трахея), 36 ракових тканин (1 рак жовчних протоків, 5 раків головного мозку, 3 раки молочної залози, 4 раки товстої кишки, 1 рак стравоходу, 3 раки нирки, 1 рак печінки, 9 раків легенів, 1 рак лімфатичних вузлів, 1 рак яєчника, 2 раки підшлункової залози, 1 рак прямої кишки, 2 раки шкіри, 1 рак сечового міхура, 1 рак матки). Фігура 1M) Ген: ARRDC3, пептид: KIPPVSPSI (SEQ ID NO.: 98) - тканини зліва направо: 2 клітинні лінії (2 нирки), 4 нормальних тканини (1 надниркова залоза, 1 легеня, 1 лімфатичний вузол, 1 плацента), 47 ракових тканин (4 раки головного мозку, 1 рак молочної

залози, 1 рак стравоходу, 1 рак жовчного міхура, 5 раків нирки, 1 рак лейкоцитів, 5 раків печінки, 12 раків легенів, 2 раки лімфатичних вузлів, 4 раки яєчника, 3 раки передміхурової залози, 2 раки шкіри, 6 раків матки). Фігура 1N) Ген: TIMP1, пептид: KLQDGLLHI (SEQ ID NO.: 103) - тканини зліва направо: 1 клітинна лінія (1 лінія клітин крові), 29 ракових тканин (2 раки головного мозку, 5 раків товстої кишки, 3 раки нирки, 1 рак печінки, 4 раки легенів, 2 раки лімфатичних вузлів, 3 раки яєчника, 1 рак підшлункової залози, 1 рак прямої кишки, 6 раків шкіри, 1 рак яєчка).

На Фігурах 2A-D показані приклади профілів експресії (відносна експресія у порівнянні з нормальною ниркою) вихідних генів за цим винаходом, які в значній мірі надмірно або виключно експресуються у НКК у панелі нормальних тканин і 35 зразках НКК. Тканини зліва направо: надниркова залоза, артерія, кістковий мозок, головний мозок (весь), молочна залоза, товста кишка, стравохід, серце, нирка (три паралельні вимірювання), лейкоцити, печінка, легеня, лімфатичний вузол, яєчник, підшлункова залоза, плацента, передміхурова залоза, слинна залоза, скелетний м'яз, шкіра, тонка кишка, селезінка, шлунок, сім'яник, тимус, щитоподібна залоза, сечовий міхур, шийка матки, матка, вена, 23 нормальних зразки нирок, 35 зразків НКК. Фігура 2A) GAL3ST1; Фігура 2B) EGLN3; Фігура 2C) APOL1; і Фігура 2D) MET.

На Фігурах 3A-F показані типові дані дослідження імунності: результати проточної цитометрії після забарвлювання пептид-специфічних мультимерів як результати відповіді *in vitro* пептид-специфічних CD8+Т-клітин здорового HLA-A*02+ донора. CD8-позитивні Т-клітини були примовані з використанням штучних АПК, навантажених моноклональними антитілами проти CD28 і HLA-A*02 у комплексі з пептидом з послідовністю Seq ID No 20 (C, ліва панель), SeqID No 34 (D, ліва панель), SeqID No 1 (E, ліва панель) або SeqID No 15 (F, ліва панель), відповідно. Після трьох циклів стимуляції були проведені визначення клітин, що реагують із пептидом, за допомогою подвійного забарвлювання мультимерів з A*02/SeqID No 20 (C), A*02/SeqID No 34 (D), A*02/SeqID No 1 (E) або A*02/SeqID No 15 (F). На правих панелях (C, D, E і F) показане контрольне забарвлення клітин, стимульованих невідповідними комплексами A*02/пептид. Проводили "гейтування" життєздатних поодиноких клітин на належність до CD8+ лімфоцитів. Булеві гейтування допомогли виключити хибнопозитивні відповіді, виявлені за допомогою мультимерів, специфічних до різних пептидів. Наведені частоти виявлення специфічних мультимер-позитивних клітин серед CD8+ лімфоцитів.

ПРИКЛАДИ

ПРИКЛАД 1

Ідентифікація і кількісне визначення рівнів пухлино-асоційованих пептидів, презентованих на поверхні клітин

Зразки тканин

Зразки тканин пухлин пацієнтів були отримані з компанії BioServe (Белтсвілл, Меріленд, США), Університетської клініки Мюнхена, Медичного університету префектури Кіото (KPUM), Університетської клініки Тюбінгена.

Нормальні (здорові) тканини були отримані з компаній Bio-Options Inc., Каліфорнія, США, BioServe, Белтсвілл, Меріленд, США, Capital BioScience Inc., Роквілл, Меріленд, США, Geneticist Inc., Глендейл, Каліфорнія, США, Університетської клініки Женеви, Університетської клініки Гейдельберга, Медичного університету префектури Кіото (KPUM); Університетської клініки Мюнхена, компанії ProteoGenex Inc., Калвер Сіті, Каліфорнія, США, Університетської клініки Тюбінгена.

До хірургічного видалення тканин або аутопсії була одержана письмова інформована згода від усіх пацієнтів. Тканини були заморожені шоковим способом безпосередньо після вирізування та зберігались до виділення TUMAP при температурі -70 °C або нижче.

Виділення пептидів HLA із зразків тканин

Пули пептидів HLA із заморожених шоковим способом зразків тканин були одержані імунним осадженням із твердих тканин відповідно до незначно зміненого протоколу (Falk et al., 1991; Seeger et al., 1999) з використанням HLA-A*02-специфічного антитіла BB7.2, використанням HLA-A, -B, C-специфічного антитіла W6/32, використанням CNBr-активованої сефарози, кислотної обробки та ультрафільтрації.

Аналіз методом мас-спектрометрії

Одержані пули пептидів HLA розділялися відповідно до їхньої гідрофобності із використанням зворотно-фазної хроматографії (nanoAcquity UPLC system, Waters), та елюйовані пептиди були проаналізовані на гібридному мас-спектрометрі LTQ-velos (ThermoElectron) з джерелом іонів типу електроспрей (ESI). Пептидні пули були завантажені безпосередньо на аналітичну мікрокапілярну колонку з плавленого кварцу (75 мкм в. д. x 250 мм), заповнену зворотно-фазним сорбентом C18 розміром 1,7 мкм (Waters), із застосуванням

швидкості потоку 400 нл на хвилину. Згодом пептиди були розділені з використанням двоетапного 180-хвилинного бінарного градієнту з 10 % до 33 % розчинника В при швидкості потоку 300 нл на хвилину. Градієнт був забезпечений розчинником А (0,1 % мурашиної кислоти у воді) та розчинником В (0,1 % мурашиної кислоти в ацетонітрилі). Був використаний скляний капіляр із золотим покриттям (PicoTip, New Objective) для введення в джерело іонів нано-ESI. Мас-спектрометри LTQ-Orbitrap працювали в інформаційно-залежному режимі з використанням стратегії TOP5. Стисло, цикл сканування був ініційований з повним скануванням при високій точності маси на Orbitrap (R=30 000) з наступними сканами MS/MS також на Orbitrap (R=7500) на 5 найбільш поширених прекурсорних іонах з динамічним виключенням раніше вибраних іонів. ТанDEMні мас-спектри були інтерпретовані програмою SEQUEST з додатковим контролем в ручному режимі. Ідентифікована пептидна послідовність була підтверджена порівнянням генерованої моделі фрагментації природного пептиду з моделлю фрагментації синтетичного контрольного пептиду з ідентичною послідовністю.

Відносне кількісне визначення на основі даних PX-MS без використання ізотопної мітки здійснювалось підрахунком іонів, тобто екстракцією і аналізом компонентів PX-MS (Mueller et al., 2007). Цей метод базується на припущенні, що площі піків PX-MS сигналів пептиду корелюють з його кількістю у зразку. Екстраговані компоненти були потім піддані обробці методами деконволюції за зарядовими станами і вирівнювання часу утримання (Mueller et al., 2008; Sturm et al., 2008). Нарешті, компоненти PX-MS були піддані обробці методом перехресних посилань з результатами ідентифікації послідовностей з метою об'єднати кількісні дані різних зразків і тканин у профілі презентації пептидів. Кількісні дані пройшли двоярусну нормалізацію відповідно до основної тенденції, з урахуванням варіабельності технічних і біологічних повторних вимірів. Отже, кожний ідентифікований пептид можна зв'язати з кількісними даними, що дозволяє провести відносний кількісний аналіз між зразками і тканинами. Крім того, усі кількісні дані, отримані для пептидів-кандидатів, були перевірені вручну для забезпечення погодженості даних і перевірки точності автоматичного аналізу. Профілі презентації були розраховані для кожного пептиду, які дозволяють оцінити середній рівень презентації у зразку, а також варіацію повторних вимірювань. Профіль зіставляє зразки НКК з фоновим рівнем зразків нормальних тканин. Профілі презентації типових надмірно презентованих пептидів показані на Фігурі 1. Показники презентації типових пептидів наведені у Таблиці 8.

Таблиця 8. Показники презентації. У таблиці наведений перелік пептидів, які надзвичайно надмірно презентуються на пухлинах у порівнянні з панеллю нормальних тканин (+++), в значній мірі надмірно презентуються на пухлинах у порівнянні з панеллю нормальних тканин (++) або надмірно презентуються на пухлинах у порівнянні з панеллю нормальних тканин (+).

SEQ ID No.	Послідовність	Презентація пептидів
1	ALIVSLPYL	+++
2	ILWREVVT	+++
3	RLLGEVQAL	+++
4	FLSQDIITV	+++
5	YLYPNLTRL	+++
6	VLFEISKTV	+++
7	FLLSLIDRL	+++
8	GLASFKSFL	+++
9	ILLQKPDSV	+++
10	KLLQNNYGL	+
11	FIQTEAPKEV	+++
12	ALDPGNGQLI	+++
13	KIMAQILTV	+
14	ALLTETIFL	++
15	ILIKHLVKV	+++
16	FMPEELPQL	+++
17	ILAQQVHAL	+++

18	YVLDLAAKV	+++
19	LLDPGSLQL	+
20	AVANTTFTV	+++
21	RLIQGDQILSV	+++
23	YIQEVVQYI	+++
24	FTLGTTVFL	++
26	SLMEILYTL	+++
27	SLSDLLVSL	++
28	FIADLVVGL	++
29	ILLDLEQAL	+
30	QLFYTKIFL	++
31	VLFGLDPAVIKV	+
32	FLAGGIRGSGA	+++
33	FIADVVEKI	+++
34	ELNNQNFYL	+++
35	VLHSLQTQL	+++
36	SLFGKKYIL	+++
37	VLAPVILML	+++
38	VLLDTILQL	+++
39	YLLNLNHLGL	+++
40	YIQEHLLQI	++
41	GLLKTQLQKL	+
42	VILDTGTIQL	+++
43	YLKDELDEL	+++
44	ALFSFVTAL	+
45	ALLGIPLTL	++
47	TLAEVRAVQEI	+
48	VVASNIMEV	+++
49	VLIVEVPGV	+++
50	SLSDHIVLL	+
51	NLWPMILTL	+++
52	SILDAVQRV	+++
55	YLALILPVL	+++
56	ILMDFSNSM	+
57	SLQKEILYL	+++
58	FLVDFEQSHL	++
60	ILWKDIEYV	+++
61	SLMGILLRI	+++
62	VLAGPAFLVQL	+++
66	TLLKTIKIV	++
67	LLDVLAPLV	+
68	YVLTQPPSV	+++
69	ILADLLPSL	++
70	SLTALRLLL	+
72	YSLEKVFGI	+

73	GLDGIPFTV	++
74	GLFHKQVTV	+
75	FLIKSINLV	++
77	SLIKHKIML	++
78	ALLDTVVQA	+
79	ALADIVWRA	+
80	KLASMLET	+
83	IQWSIVPEV	++
86	GLLQGKLALL	+
88	TLAELHISL	+
89	SLLAVTEV	+
90	FTLEKNFVI	++
91	MLLSSLVSL	+
92	FLFRDILEL	+++
93	GVMAGDIYSV	++
94	ILHHKVYDL	+
96	TLAETLVNL	+
97	TLISELVQA	+
98	KIPPVSPSI	+++
99	GLAPHLEQI	+
100	KLNVAPLAV	+
101	HIYDKAFITV	++
102	LLFDVHTTL	+
103	KLQDGLLHI	+++
104	ALFEGVVRQI	+++
105	ALADLDELLIRA	++
106	VLMDLKALL	+
107	VLMDLKALLL	++
108	VLISVLQAI	++
109	YLWSRVEKL	+
110	LLDLHSYLL	+
111	TLLETEMLL	+++
112	LLFDHLEPIEL	+
113	SLFDWNVKL	++
114	ALAVNISAA	++
115	LLDPKTIFL	+++
116	GLVDIMVHL	+++
117	VLFGELPAL	+++
118	FLNAIETAL	+++
119	RLHDENILL	+++
120	GLAGDNIYL	+++
121	ALLRTVVSV	++
122	SLDPSSPQV	++
123	YVDPVITSI	++
124	ILSPLSVAL	+

125	KLDPTKTTL	+++
126	KIQEILTQV	+++
127	VLAPLFVYL	++
128	YLEEDVYQL	+++
129	VLAPRVLRA	++
130	ALPTVLVGV	++
131	VMAGDIYSV	++
132	SVASTITGV	++
133	QLIDYERQL	++
134	VADKIHSV	+++
135	VVDEGPTGV	+++
136	YQDPHSTAV	++
137	TLVAIVGV	++
138	SLDTLMTYV	++
139	ILNVDGLIGV	++
140	SLANNVTSV	++
141	LLVDDSFLHTV	+++
143	ALFVRLLALA	++
145	SLHFLILYV	+
150	TLMPNINKL	+++
151	YMYEGPAPRI	+++

ПРИКЛАД 2

Профілі експресії генів, що кодують пептиди за винаходом

- Надмірна презентація або специфічна презентація пептиду 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.

Джерела та приготування РНК

- Зразки тканин, видалені хірургічним шляхом, були придбані у зазначених вище джерел (див. Приклад 1) після одержання письмової інформованої згоди від кожного пацієнта. Зразки пухлинної тканини були миттєво заморожені в рідкому азоті безпосередньо після хірургічної операції та пізніше гомогенізовані з використанням ступки та товчача під рідким азотом. Тотальна РНК була приготувана 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.

- Тотальна РНК зі здорових тканин людей була одержана комерційним шляхом (Ambion, Хантингтон, Велика Британія; Clontech, Гейдельберг, Німеччина; Stratagene, Амстердам, Нідерланди; BioChain, Хейард, Каліфорнія, США). РНК від кількох осіб (від 2 до 123 осіб) були змішані таким чином, щоб РНК від кожної особи була рівнозважена.

- Якість та кількість усіх зразків РНК були оцінені на біоаналізаторі Agilent 2100 (Agilent, Вальдброн, Німеччина), з використанням комплекту RNA 6000 Pico LabChip Kit (Agilent).

Експерименти з використанням мікрочипів

- Аналіз генної експресії усіх зразків РНК пухлинних і нормальних тканин був виконаний з використанням олігонуклеотидних мікрочипів Affymetrix Human Genome (HG) U133A або HG-U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Санта Клара, Каліфорнія, США). Усі етапи виконувалися відповідно до посібника Affymetrix. Стисла, дволанцюгова кДНК була синтезована з 5–8 мкг тотальної РНК, з використанням SuperScript RTII (Invitrogen) та оліго-dT-T7-праймеру (MWG Biotech, Еберсберг, Німеччина), як описано в посібнику. Транскрипція In vitro була виконана з використанням

комплекту маркування РНК-транскриптів BioArray High Yield RNA Transcript Labelling Kit (ENZO Diagnostics, Inc., Фармінгдейл, Нью-Йорк, США) для чипів U133A або комплекту GeneChip IVT Labelling Kit (Affymetrix) для чипів U133 Plus 2.0, після чого були здійснені кРНК-фрагментація, гібридизація та забарвлювання стрептавідин-фікоеритрином та біотинільованим анти-стрептавідиновим антитілом (Molecular Probes, Лейден, Нідерланди). Зображення були скановані приладом Agilent 2500A GeneArray Scanner (U133A) або Affymetrix Gene-Chip Scanner 3000 (U133 Plus 2.0). Дані аналізувалися за допомогою програми GCOS (Affymetrix), з використанням стандартних установок для усіх параметрів. Для нормалізації були застосовані 100 службових генів, наданих компанією Affymetrix. Відносні значення експресії були розраховані по відношенням логарифмів зареєстрованих сигналів, наданим комп'ютерною програмою, причому значення для нормального зразка тканин нирки було довільно встановлене на 1,0. Типові профілі експресії вихідних генів цього винаходу, які в значній мірі надмірно або виключно експресуються у НКК, показані на Фігурі 2. Показники презентації додаткових типових генів наведені у Таблиці 9.

Таблиця 9

Показники презентації у таблиці наведений перелік пептидів, які отримані з генів, що надзвичайно надмірно презентуються на пухлинах у порівнянні з панеллю нормальних тканин (+++), в значній мірі надмірно презентуються на пухлинах у порівнянні з панеллю нормальних тканин (++) або надмірно презентуються на пухлинах у порівнянні з панеллю нормальних тканин (+)

Seq ID NO	Назва гена	Послідовність	Експресія генів
1	SLC17A3	ALIVSLPYL	++
2	HSF4	ILWREVVT	++
3	HSF4	RLLGEVQAL	++
6	ATP11A	VLFEISKTV	+
7	EGLN3	FLLSLIDRL	++
18	ACLY	YVLDLAAKV	+
28	ENO1, ENO2, ENO3	FIADLVVGL	+
35	ANGPTL4	VLHSLQTQL	++
37	ABCC3	VLAPVILML	+
40	IVNS1ABP	YIQEHLQI	+
50	ITGA3	SLSDHIVLL	+
51	ITGA3	NLWPMILTL	+
55	SLC16A4	YLALILPVL	+
59	TGFB1	SLKNNVSV	+
62	SLC47A1	VLGPAFLVQL	+
63	ERAP1	GLIEDHFDVTV	+
65	TPI1, TPI1P1	IYGGSVTGA	+
76	PDZK1P2, PDZK1, PDZK1P1	VLADDHLIEV	++
81	LRP2	SLLPALPKL	+
87	APOL1	LADGVQKV	++
93	PLIN2	GVMAGDIYSV	+
94	CYB5A	ILHHKVYDL	+
101	FLT1	HIYDKAFITV	++
105	HSPG2	ALADLDELLIRA	+
115	HAVCR1	LLDPKTIFL	+
120	SLC22A2	GLAGDNIYL	+

122	GAL3ST1	SLDPSSPQV	+++
123	MET	YVDPVITSI	++
125	NDRG1	KLDPTKTTL	+
127	FZD2,FZD1,FZD7	VLAPLFVYL	+
131	PLIN2	VMAGDIYSV	+
132	PLIN2	SVASTITGV	+
137	FKBP10	TLVAIVVGV	+
139	ACLY	ILNVDGLIGV	+
143	TGFBI	ALFVRLLALA	+

ПРИКЛАД 3

Імуногенність In vitro презентованих МНС І класу пептидів

Щоб отримати інформацію стосовно імуногенності TUMAP за цим винаходом, автори винаходу провели дослідження з використанням примування Т-клітин in vitro на основі повторної стимуляції CD8+Т-клітин штучними антиген-презентуючими клітинами (штучними АПК), навантаженими комплексами пептид/МНС і антитілами проти CD28. У такий спосіб була показана імуногенність на цей час 22 TUMAP за цим винаходом, рестрикованих за HLA-A*0201, що продемонструвало, що ці пептиди є епітопами Т-клітин, проти яких в організмі людини існують попередники CD8+Т-клітин (Таблиця 10).

Примування CD8+Т-клітин in vitro

Для проведення стимуляції in vitro штучними антиген-презентуючими клітинами, завантаженими комплексом пептид-МНС (рМНС) та антитілами проти CD28, спочатку були виділені CD8+Т-клітини зі свіжих продуктів лейкофезу HLA-A*02 шляхом позитивного відбору з використанням анти-CD8 мікрогранул (Miltenyi Biotec, Бергш-Гладбах, Німеччина) здорових донорів, отриманих із Клініки Університету міста Мангейм, Німеччина, після одержання інформованої згоди.

МКПК і виділені CD8+-лімфоцити інкубували аж до використання в Т-клітинному середовищі (TCM), що складається з RPMI-Glutamax (Invitrogen, Карлсруе, Німеччина) з додаванням 10 % термічно інактивованої АВ-сироватки людини (PAN-Biotech, Ейденбах, Німеччина), 100 Од/мл пеніциліну/100 мкг/мл стрептоміцину (Cambrex, Кельн, Німеччина), 1 мМ пірувату натрію (CC Pro, Обердорла, Німеччина), 20 мкг/мл гентаміцину (Cambrex). Цитокіни у концентраціях 2,5 нг/мл ІЛ-7 (PromoCell, Гейдельберг, Німеччина) та 10 Од/мл ІЛ-2 (Novartis Pharma, Нюрнберг, Німеччина) також додавалися до TCM на цьому етапі культивування.

Приготування мікросфер, покритих рМНС і антитілами проти CD28, Т-клітинні стимуляції та зчитування виконувалися у добре вивченій системі in vitro з використанням чотирьох різних молекул рМНС для кожної стимуляції і 8 різних молекул рМНС для кожної умови зчитування.

Очищені костимулювальні антитіла мишачого IgG2a проти CD28 людини Ab 9.3 (Jung et al., 1987) були хімічно біотинільовані за допомогою сульфо-N-гідроксисукцинімідобіотину, як рекомендовано виробником (Perbio, Бонн, Німеччина). Використовували поліістерольні гранули діаметром 5,6 мкм, покриті стрептавідином (Bangs Laboratories, Іллінойс, США).

рМНС, використаними як позитивний і негативний контроль, були A*0201/MLA-001 (пептид ELAGIGILTV (SEQ ID NO. 152) з модифікованого Melan-A/MART-1) та A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI з DDX5 (SEQ ID NO. 153)), відповідно.

В 96-лункові планшети вносили 800 000 мікрогранул/200 мкл у присутності $4 \times 12,5$ нг різних біотинільованих комплексів рМНС, промивали та додавали 600 нг біотинільованих антитіл проти CD28 в об'ємі 200 мкл. Стимуляція була проведена в планшетах на 96 лунок шляхом спільного інкубування 1×10^6 CD8+Т-клітин із 2×10^5 промитих мікрогранул з покриттям у 200 мкл TCM з доданням 5 нг/мл ІЛ-12 (PromoCell) протягом 3 днів за температури 37 °С. Половина середовища була потім замінена свіжим TCM з доданням 80 Од/мл ІЛ-2, та інкубування продовжували 4 дні за 37 °С. Цей цикл стимуляції був виконаний загалом три рази. Для зчитування з рМНС-мультимерів з використанням 8 різних молекул рМНС для кожної умови зчитування застосовувалося двомірне структурне кодування як описано раніше (Andersen et al., 2012) з невеликими модифікаціями, які стосуються зв'язування з п'ятьма різними флуорохромами. Нарешті, був проведений аналіз мультимерів за допомогою забарвлювання клітин барвником для визначення їхньої життєздатності Live/dead у ближньому ІК-діапазоні (Invitrogen, Карлсруе, Німеччина), клону антитіл CD8-FITC SK1 (BD, Гейдельберг, Німеччина) і флуоресцентних рМНС-мультимерів. Для аналізу використовували цитометр BD LSRII SORP,

обладнаний відповідними лазерами і фільтрами. Пептидо-специфічні клітини були розраховані як відсоток від загальної кількості CD8-позитивних клітин. Оцінка результатів мультимерного аналізу була виконана за допомогою комп'ютерної програми FlowJo (Tree Star, Орегон, США). Примування *in vitro* специфічних мультимер-позитивних CD8+ лімфоцитів було визначене порівнянням зі стимуляціями негативних контролів. Імуногенність для даного антигену визначалася, якщо було виявлено, що принаймні одна оцінювана *in vitro* стимульована лунка одного здорового донора містить специфічні CD8+T-клітини після стимуляції *in vitro* (тобто коли ця лунка містила хоча б 1 % специфічних мультимер-позитивних серед CD8+T-клітин та відсоток специфічних мультимер-позитивних клітин був принаймні в 10 разів більше медіанного значення стимуляцій відповідних негативних контролів).

Імуногенність *in vitro* для пептидів у хворих на НКК

Для перевірених пептидів HLA I класу імуногенність *in vitro* можна продемонструвати генерацією пептидо-специфічних T-клітинних ліній. Типові результати цитометрії після TUMAP-специфічного мультимерного забарвлення для 2 пептидів за винаходом показані на Фігурі 3, разом із відповідними негативними контролями. Результати для 3 пептидів за винаходом зведені у Таблиці 10А) і Б).

Таблиця 10А. Імуногенність *in vitro* пептидів HLA класу I за винаходом

Типові результати експериментів по визначенню імуногенності *in vitro*, проведених подавцем заявки, для пептидів за винаходом. <20 % = +; 20 % – 49 % = ++; 50 % – 69 % = +++; >= 70 % = ++++

Seq ID	Ід. № пептиду	лунки	донори
123	YVDPVITSI	+	++++
127	VLAPLFVYL	++	++++
143	ALFVRLLALA	+	+++

Таблиця 10Б. Імуногенність *in vitro* пептидів HLA класу I за винаходом

Типові результати експериментів по визначенню імуногенності *in vitro*, проведених подавцем заявки, для пептидів за винаходом. Наведені результати експериментів по визначенню імуногенності *in vitro*. Відсоткові долі позитивних лунок і донорів (серед оцінюваних) зведені як зазначено <20 % = +; 20 % – 49 % = ++; 50 % – 69 % = +++; >= 70 % = ++++

SEQ ID No	Послідовність	Позитивні лунки [%]
1	ALIVSLPYL	+
2	ILWREVVT	+
3	RLLGEVQAL	+
6	VLFEISKTV	+
7	FLLSLIDRL	+
9	ILLQKPDSV	+
15	ILIKHLVKV	+
16	FMPEELPQL	+
18	YVLDLAAKV	++
20	AVANTTFTV	+
22	FLSPPLPSV	++
29	ILLDLEQAL	+
34	ELNNQNFYL	++
36	SLFGKKYIL	++
94	ILHHKVYDL	++
95	KLTDVGIATL	++++
98	KIPPVSPSI	++++

ПРИКЛАД 4

Синтез пептидів

Усі пептиди були синтезовані стандартним і широко використовуваним методом твердофазного синтезу пептидів за стратегією Fmoc. Ідентичність і чистоту кожного окремого пептиду визначали методами мас-спектрометрії і аналітичної ЗФ-ВЕРХ. Пептиди одержували у вигляді білих або брудно-білих ліофілізатів (солей фторацетатів) чистотою >50 %. Усі TUMAP

переважно вводять у вигляді трифторацетатних солей або ацетатних солей, використання інших солей також можливе.

ПРИКЛАД 5

Аналіз зв'язування з МНС

Пептиди-кандидати для Т-клітинної терапії за цим винаходом були додатково перевірені на здатність зв'язуватися з МНС (афінність). Окремі комплекси пептид-МНС були отримані УФ-індукованим обміном лігандів, за якого УФ-чутливі пептиди розщеплюються під дією УФ-випромінювання, і аналізується продукт обміну з пептидом, що вивчається. Тільки пептиди-кандидати, які здатні ефективно зв'язуватися з пептид-сприйнятливими молекулами МНС і стабілізувати їх, попереджають дисоціацію комплексів із МНС. Для визначення виходу реакції обміну проводили аналіз методом ELISA на основі виявлення легких ланцюгів ($\beta 2m$) стабілізованих комплексів із МНС. Аналіз проводили згідно з загальним описом у роботі Rodenko і співавт. (Rodenko et al., 2006).

96-лункові планшети MAXISorp (NUNC) були покриті протягом ночі розчином 2 мкг/мл стрептавідину у PBS при кімнатній температурі, 4 рази промиті і блоковані протягом 1 год. при 37 °C у 2 % розчині БСА, що містить блокувальний буфер. Ренатуровані мономери HLA-A*02:01/MLA-001 використовувались як стандарти, охоплюючи діапазон 15–500 нг/мл. Мономерні комплекси пептид-МНС, продукти реакції обміну, що протікає під дією УФ-випромінювання, розводили у 100 разів у блокувальному буфері. Зразки інкубували протягом 1 год. за температури 37 °C, промивали чотири рази, інкубували з 2 мкг/мл кон'югованих із пероксидазою хрину антитіл проти $\beta 2m$ протягом 1 год. за температури 37 °C, знову промивали і визначали з розчином ТМБ, реакцію зупиняли за допомогою NH_2SO_4 . Поглинання вимірювали при 450 нм. Пептиди-кандидати, що демонстрували високий вихід реакції обміну (переважно вище 50 %, найбільш переважно вище 75 %) є зазвичай переважними для синтезу і продукції антитіл або їх фрагментів і (або) рецепторів Т-клітин або їх фрагментів, оскільки вони показують достатню авідність до молекул МНС і попереджають дисоціацію комплексів МНС.

Таблиця 11. Показники зв'язування з молекулами МНС I класу

Зв'язування пептидів, рестрикованих за молекулами HLA I класу, з HLA-A*02 було класифіковане за виходом реакції обміну пептидів: >10 % = +; >20 % = ++; >50 % = +++; >75 % = ++++.

Seq ID	Послідовність	Обмін пептидів
1	ALIVSLPYL	+++
2	ILWREVVTL	+++
3	RLLGEVQAL	++
4	FLSQDIITV	+++
5	YLYPNLTRL	++
6	VLFEISKTV	+++
7	FLLSLIDRL	+++
8	GLASFKSFL	++
9	ILLQKPDSV	++
10	KLLQNNYGL	++
11	FIQTEAPKEV	++
12	ALDPGSGNQLI	++
13	KIMAQILTV	+++
14	ALLTETIFL	++
15	ILIKHLVKV	++
16	FMPEELPQL	++
17	ILAQQVHAL	+++
18	YVLDLAAKV	+++
19	LLDPGSLQL	++
20	AVANTTFTV	++
21	RLIQGDQILSV	++
22	FLSPPLPSV	+++
23	YIQEVVQYI	+++
24	FTLGTTVFL	+++
25	LLVPAHLVAA	++
27	SLSDLLVSL	+++
28	FIADLVVGL	++

Seq ID	Послідовність	Обмін пептидів
29	ILLDLEQAL	+++
30	QLFYTKIFL	++
31	VLFGLDPAVIKV	+++
33	FIADVVEKI	++
34	ELNNQNFYL	+++
35	VLHSLQTQL	++
36	SLFGKKYIL	++
37	VLAPVILML	++
38	VLLDTILQL	+++
39	YLLNLNHLGL	+++
40	YIQEHLLQI	+++
41	GLLKTLOKL	++
42	VILDTGTIQL	++
43	YLKDELDEL	+++
44	ALFSFVTAL	+++
45	ALLGIPLTL	+++
46	GLSEVLVQI	+++
47	TLAEVRVQEI	+++
48	VVASNIMEV	++
49	VLIVEVPGV	+++
50	SLSDHIVLL	++
51	NLWPMILTL	+++
52	SILDAVQRV	++
53	FLLEIRQTL	++
54	ALVAKGLVQA	++
55	YLALILPVL	++
56	ILMDFSNSM	+++
57	SLQKEILYL	++
58	FLVDFEQSHL	++++
59	SLKNNVVS	+++
60	ILWKDIEYV	+++
61	SLMGILLRI	++
62	VLGPAFLVQL	+++
63	GLIEDHFDVTV	++
64	LLAASVALA	++
65	IYGGSVTGA	++
66	TLLKTIKV	++
67	LLDVLAPLV	++
68	YVLTQPPSV	++
69	ILADLLPSL	++
70	SLTALRLLL	++
71	ALDGHLYAV	+++
72	YSLEKVFGI	++
73	GLDGIPFTV	+++
74	GLFHKQVTV	+++
75	FLIKSINLV	+++
76	VLADDHLIEV	++
77	SLIKHKIML	++
78	ALLDTVVQA	++
79	ALADIVWRA	+++
80	KLASMLETL	+++
81	SLLPALPKL	++
82	SLLQATDFMSL	+++
83	IQWSIVPEV	+++
84	YLMDEGAHL	++
85	FVMSEIRTV	+++
86	GLLQGKLALL	++

Seq ID	Послідовність	Обмін пептидів
88	TLAELHISL	++
89	SLLLAVTEV	++
90	FTLEKNFVI	++
91	MLLSSLVSL	++
92	FLFRDILEL	+++
93	GVMAGDIYSV	++++
94	ILHHKVYDL	++
95	KLTDVGIATL	++
96	TLAETLVNL	+++
97	TLISELVQA	++
98	KIPPVSPSI	++
99	GLAPHLEQI	++
100	KLNVAPLAV	++
101	HIYDKAFITV	++
102	LLFDVHTTL	+++
103	KLQDGLLHI	++
104	ALFEGVVRQI	+++
105	ALADLDELLIRA	+++
106	VLMDLKALL	+++
107	VLMDLKALLL	+++
108	VLISVLQAI	++
109	YLWSRVEKL	++++
110	LLDLHSYLL	++
111	TLLETEMLL	++
112	LLFDHLEPIEL	+++
113	SLFDWNVVKL	+++
114	ALAVNISAA	+++

ПРИКЛАД 6

Абсолютне кількісне визначення рівнів пухлино-асоційованих пептидів, презентованих на поверхні клітин

- 5 Отримання зв'язувачів, таких як антитіла і (або) ТКР, є трудомістким процесом, який можна провести лише для обмеженої кількості вибраних мішеней. У випадку пухлино-асоційованих і пухлино-специфічних пептидів критерії вибору включають, але не обмежуються ними, винятковість презентації і щільність пептиду, презентованого на поверхні клітини. Підрахунок числа копій пептиду TUMAP на одну клітину в зразках солідних пухлин потребує абсолютного
- 10 кількісного визначення пептидів TUMAP, визначення ефективності виділення TUMAP і числа клітин на зразку тканини, що аналізується.

Кількісне визначення пептидів методом наноPX-МС/МС

- Для точного кількісного визначення пептидів методом мас-спектрометрії для кожного пептиду була побудована калібрувальна крива з використанням методу внутрішнього
- 15 стандарту. Внутрішній стандарт є подвійно мічений ізотоп версії кожного пептиду, тобто дві мічені ізотопом амінокислоти були введені під час синтезу TUMAP. Він відрізняється від пухлино-асоційованого пептиду лише своєю масою, але не має відмінностей у інших фізико-хімічних властивостях (Anderson et al., 2012). Внутрішній стандарт вводили як стандартну
- 20 добавку у кожний зразок для МС, і усі МС сигнали були нормалізовані відносно МС сигналу внутрішнього стандарту для згладжування можливих технічних флуктуацій між результатами МС вимірювань.

- Калібрувальні криві були зняті принаймні у трьох різних матрицях, тобто елюатах пептиду HLA з природних зразків, подібних до звичайних зразків для МС, і кожний препарат пройшов
- 25 вимірювання у двох прогонах на мас-спектрометрі. Для оцінки МС сигнали були нормалізовані відносно сигналу внутрішнього стандарту, а калібрувальну криву розраховували методом логістичного регресійного аналізу.

- Для кількісного визначення пухлино-асоційованих пептидів із зразків тканини у відповідні зразки вводили внутрішній стандарт як стандартну добавку; здійснювали нормалізацію МС
- 30 сигналів відносно сигналу внутрішнього стандарту і кількісне визначення за допомогою калібрувальної кривої пептиду.

Ефективність виділення комплексів пептид/МНС

Як і для кожного процесу очищення білків, виділення білків із зразків тканини пов'язано з певними втратами білка, що вивчається. Для визначення ефективності виділення TUMAP були отримані комплекси пептид-МНС для всіх пептидів TUMAP, вибраних для абсолютного кількісного визначення. Щоб розрізнити комплекси пептид-МНС, до яких вводили стандартні

5 добавки, і комплекси з природними пептидами, були використані версії TUMAP із однократним міченням ізотопом, тобто одна мічена ізотопом амінокислота була введена під час синтезу TUMAP. Ці комплекси були додані як стандартні добавки до свіжеприготованих лізатів тканин, тобто у найранішій можливій точці процедури виділення TUMAP, а потім уловлені у вигляді комплексів природний пептид-МНС у подальшому афінному очищенні. Таким чином,

10 вимірювання ступеня вилучення однократно мічених TUMAP дозволяє зробити висновки щодо ефективності виділення індивідуальних природних TUMAP.

Ефективність виділення аналізували на низькій кількості зразків, і її значення були зіставні для цих зразків тканин. Навпаки, ефективність виділення індивідуальних пептидів є різною. Це наводить на думку, що ефективність виділення, хоча й визначена лише у невеликій кількості

15 зразків тканин, можна екстраполювати на будь-який інший тканинний препарат. Однак є необхідним аналізувати кожний TUMAP індивідуально, оскільки ефективність виділення неможливо екстраполювати з одного зразка на інші.

Визначення числа клітин у твердій замороженій тканині

Щоб визначити число клітин у зразках тканин, для яких проводили підрахунок абсолютної

20 кількості пептиду, автори винаходу застосували аналіз вмісту ДНК. Цей метод є застосовним до широкого діапазону зразків різного походження і, що найбільш важливо, до заморожених зразків (Alcoser et al., 2011; Forsey and Chaudhuri, 2009; Silva et al., 2013). Під час стандартної процедури виділення пептидів із зразка тканини отримували гомогенний лізат, із якого відбирали невелику аліквоту. Аліквоту ділили на три частини, із яких виділяли ДНК (набір QiaAmp DNA Mini, Qiagen, Хільден, Німеччина). Сумарний вміст ДНК у кожному зразку виділеної

25 ДНК кількісно визначали флуоресцентним методом кількісного визначення ДНК (набір для кількісного визначення Qubit dsDNA HS, Life Technologies, Дармштадт, Німеччина) щонайменше у двох повторних вимірюваннях.

Для розрахунку кількості клітин будували стандартну криву для ДНК на основі аліквот

30 індивідуальних здорових клітин крові, з діапазоном визначених кількостей клітин. Стандартну криву використовували для розрахунку загального вмісту клітин із сумарного вмісту ДНК у кожному зразку виділеної ДНК. Середнє значення загального числа клітин у зразку тканини, який використовували для виділення пептидів, екстраполювали з урахуванням відомого об'єму аліквот лізату і загального об'єму лізату.

Кількість копій пептиду на одну клітину

Використовуючи дані згаданих вище експериментів, автори винаходу розраховували кількість

35 копій TUMAP на одну клітину, розділивши загальну кількість пептиду на загальне число клітин у зразку, з наступним діленням на ефективність виділення. Кількість копій клітин для вибраних пептидів наведена у Таблиці 12.

40 Таблиця 12. Абсолютні кількості копій. У таблиці наведені результати абсолютного кількісного визначення у зразках пухлин НДРЛ. Медіанні кількості копій на клітину наведені для кожного пептиду: <100 = +; >=100 = ++; >=1000 +++; >=10 000 = +++. Наводиться кількість зразків, для яких є в наявності оцінювані високоякісні дані MC.

SEQ ID No.	Код пептиду	Кількість копій на клітину (медіана)	Кількість зразків
1	SLC17A3-001	++	18

Список посилань

PLoS.One. 10 (2015): e0119247

Agalliu, I. et al., JAMA Neurol. 72 (2015): 58-65

Agesen, T. H. et al., Gut 61 (2012): 1560-1567

Alagaratnam, S. et al., Int.J Androl 34 (2011): e133-e150

Alcoser, S. Y. et al., BMC.Biotechnol. 11 (2011): 124

Alholle, A. et al., Epigenetics. 8 (2013): 1198-1204

Allison, J. P. et al., Science 270 (1995): 932-933

Altman, M. K. et al., Biochem.Res.Int. 2012 (2012): 518437

Amatschek, S. et al., Cancer Res 64 (2004): 844-856

Anastas, J. N. et al., J Clin Invest 124 (2014): 2877-2890

Andersen, R. K. et al., Pigment Cell Melanoma Res. 28 (2015): 267-280

Andersen, R. S. et al., Nat.Protoc. 7 (2012): 891-902

- Anderson, L. N. et al., PLoS.One. 8 (2013): e66768
- Anderson, N. L. et al., J Proteome.Res 11 (2012): 1868-1878
- Antony-Debre, I. et al., Cancer Cell 27 (2015): 609-611
- Appay, V. et al., Eur.J Immunol. 36 (2006): 1805-1814
- 5 Araujo, W. F. et al., Urol.Oncol (2015)
- Arribas, A. J. et al., Blood 125 (2015): 1922-1931
- Asad, M. et al., Cell Death.Dis. 5 (2014): e1346
- Asaga, S. et al., Anticancer Res. 26 (2006): 35-42
- Avery-Kiejda, K. A. et al., BMC.Cancer 14 (2014): 253
- 10 Avigan, D. et al., Clin Cancer Res. 10 (2004): 4699-4708
- Awasthi, N. et al., Cancer Lett. 358 (2015): 59-66
- Ayshamgul, H. et al., Chin Med.J (Engl.) 124 (2011): 341-346
- Bae, D. H. et al., J Clin Pathol. 66 (2013): 911-917
- Baek, G. et al., Cell Rep. 9 (2014): 2233-2249
- 15 Baenke, F. et al., J Pathol. (2015)
- Bai, L. et al., J Cell Biochem. 113 (2012): 322-328
- Banchereau, J. et al., Cell 106 (2001): 271-274
- Bao, B. Y. et al., Clin Cancer Res. 17 (2011): 928-936
- Bao, W. et al., Biomed.Pharmacother. 70 (2015): 97-102
- 20 Basson, M. D. et al., Mol.Oncol 9 (2015): 513-526
- Bauer, K. M. et al., J Proteome.Res. 13 (2014): 4910-4918
- Beatty, G. et al., J Immunol 166 (2001): 2276-2282
- Bedir, R. et al., Iran J Otorhinolaryngol. 27 (2015): 69-74
- Beggs, J. D., Nature 275 (1978): 104-109
- 25 Belefond, D. et al., Clin Cancer Res. 16 (2010): 398-409
- Bell, J. L. et al., Cell Mol Life Sci. 70 (2013): 2657-2675
- Benjamini, Y. et al., Journal of the Royal Statistical Society.Series B (Methodological), Vol.57 (1995): 289-300
- Bhatnagar, R. et al., Oral Oncol 48 (2012): 831-835
- 30 Bill, K. L. et al., Lab Invest (2015)
- Blanke, K. L. et al., Cancer Causes Control 25 (2014): 1513-1521
- Bleumer, I. et al., Eur.Urol. 44 (2003): 65-75
- Bonventre, J. V., Trans.Am.Clin Climatol.Assoc. 125 (2014): 293-299
- Boulter, J. M. et al., Protein Eng 16 (2003): 707-711
- 35 Braumuller, H. et al., Nature (2013)
- Brendle, A. et al., Carcinogenesis 29 (2008): 1394-1399
- Brossart, P. et al., Blood 90 (1997): 1594-1599
- Bruckdorfer, T. et al., Curr.Pharm.Biotechnol. 5 (2004): 29-43
- Bunatova, K. et al., Anticancer Res. 32 (2012): 4601-4606
- 40 Card, K. F. et al., Cancer Immunol Immunother. 53 (2004): 345-357
- Carvalho, F. L. et al., Prostate 74 (2014): 933-945
- Chanock, S. J. et al., Hum.Immunol. 65 (2004): 1211-1223
- Chatterjee, M. et al., Haematologica 98 (2013): 1132-1141
- Chen, K. et al., J Cancer Res.Clin Oncol 140 (2014a): 1715-1721
- 45 Chen, Q. et al., PLoS.One. 9 (2014b): e88386
- Chen, S. T. et al., Cancer Sci. 102 (2011): 2191-2198
- Chen, Y. C. et al., Int.J Cancer 135 (2014c): 117-127
- Chen, Y. L. et al., Int J Surg. 11 (2013): 85-91
- Cheng, A. S. et al., Gastroenterology 144 (2013): 122-133
- 50 Cheng, J. et al., Cancer Lett. 310 (2011): 35-45
- Cheon, D. J. et al., Clin Cancer Res 20 (2014): 711-723
- Cho, E. et al., Hematol.Oncol.Clin.North Am. 25 (2011): 651-665
- Chong, Y. et al., Oncol Rep. 31 (2014): 2535-2544
- Chu, X. et al., Asian Pac.J Cancer Prev. 15 (2014): 5819-5823
- 55 Cohen, C. J. et al., J Mol Recognit. 16 (2003a): 324-332
- Cohen, C. J. et al., J Immunol 170 (2003b): 4349-4361
- Cohen, S. N. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 69 (1972): 2110-2114
- Coligan, J. E. et al., Current Protocols in Protein Science (1995)
- Colombetti, S. et al., J Immunol. 176 (2006): 2730-2738
- 60 Cuadros, T. et al., Cancer Res 74 (2014): 1416-1428

- Cuadros, T. et al., *Eur.J Cancer* 49 (2013): 2034-2047
- D'Angelo, V. et al., *J Neurooncol.* 117 (2014): 287-294
- Dadkhah, E. et al., *Arch.Iran Med.* 16 (2013): 463-470
- Dannenmann, S. R. et al., *Cancer Immunol.Res.* 1 (2013): 288-295
- 5 Davidov, T. et al., *J Surg.Res.* 190 (2014): 565-574
- Deng, B. et al., *Tumour.Biol.* (2015)
- Dengjel, J. et al., *Clin Cancer Res* 12 (2006): 4163-4170
- Denkberg, G. et al., *J Immunol* 171 (2003): 2197-2207
- Devaney, J. M. et al., *Prostate Cancer Prostatic.Dis.* 16 (2013): 292-300
- 10 Dey, N. et al., *PLoS.One.* 8 (2013): e77425
- Dienstmann, R. et al., *Am.Soc.Clin Oncol Educ.Book.* 35 (2015): e149-e156
- Ding, L. C. et al., *Oncol Rep.* (2015)
- Dong, R. et al., *PLoS.One.* 9 (2014): e85599
- El Behery, M. M. et al., *Arch.Gynecol.Obstet.* 288 (2013): 1371-1376
- 15 Elewa, M. A. et al., *Clin Exp.Metastasis* (2015)
- Elouazzani, H. et al., *J Clin Imaging Sci.* 4 (2014): 33
- Falk, K. et al., *Nature* 351 (1991): 290-296
- Fan, H. Z. et al., *J Cancer Res.Clin Oncol* 135 (2009): 591-602
- Fang, Z. Q. et al., *Genet.Mol Res* 12 (2013): 1479-1489
- 20 Fei, J. et al., *Tumour.Biol.* 34 (2013): 2329-2335
- Felizola, S. J. et al., *J Steroid Biochem.Mol.Biol.* 144 Pt B (2014): 410-416
- Feng, H. et al., *J Clin Invest* 124 (2014): 3741-3756
- Ferguson, B. W. et al., *BMC.Cancer* 13 (2013): 593
- Fernandez-Banet, J. et al., *Genomics* 103 (2014): 189-203
- 25 Ferrer-Ferrer, M. et al., *Arch.Med.Res* 44 (2013): 467-474
- Findeis-Hosey, J. J. et al., *Biotech.Histochem.* 87 (2012): 24-29
- Finocchiaro, G. et al., *Ann.Transl.Med.* 3 (2015): 83
- Fleischer, M. et al., *Genes Chromosomes.Cancer* 50 (2011): 1010-1020
- Fong, L. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98 (2001): 8809-8814
- 30 Fontes-Oliveira, C. C. et al., *Biochim.Biophys.Acta* 1830 (2013): 2770-2778
- Forconi, F. et al., *Haematologica* 93 (2008): 697-705
- Forloni, M. et al., *Cancer Res.* 70 (2010): 916-924
- Forsey, R. W. et al., *Biotechnol.Lett.* 31 (2009): 819-823
- Franco, R. et al., *Histol.Histopathol.* 30 (2015): 707-714
- 35 Fu, Q. F. et al., *J Hematol.Oncol* 8 (2015): 22
- Fu, Y. et al., *Mol.Biol.Rep.* 38 (2011): 693-702
- Fujinaga, T. et al., *Int.J Oncol* 44 (2014): 1614-1624
- Gabrilovich, D. I. et al., *Nat Med.* 2 (1996): 1096-1103
- Gackiere, F. et al., *Biol.Open.* 2 (2013): 941-951
- 40 Gadd, S. et al., *Lab Invest* 90 (2010): 724-738
- Gantsev, S. K. et al., *Biomed.Pharmacother.* 67 (2013): 363-366
- Gao, H. et al., *Cancer Lett.* 344 (2014): 54-61
- Gao, H. J. et al., *J Cancer Res.Clin Oncol* 141 (2015a): 1151-1162
- Gao, W. et al., *BMC.Cancer* 15 (2015b): 367
- 45 Garg, M. et al., *Cancer* 116 (2010a): 3785-3796
- Garg, M. et al., *Eur.J Cancer* 46 (2010b): 207-215
- Garner, J. M. et al., *PLoS.One.* 10 (2015): e0125838
- Gattinoni, L. et al., *Nat Rev.Immunol* 6 (2006): 383-393
- Gbormittah, F. O. et al., *J Proteome.Res.* 13 (2014): 4889-4900
- 50 Gilkes, D. M. et al., *Mol Cancer Res* 11 (2013): 456-466
- Giovannetti, E. et al., *J Natl.Cancer Inst.* 106 (2014): djt346
- Gnjatic, S. et al., *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100 (2003): 8862-8867
- Godkin, A. et al., *Int.Immunol* 9 (1997): 905-911
- Goksel, G. et al., *J BUON.* 19 (2014): 207-214
- 55 Gomez-Villafuertes, R. et al., *J Neurochem.* 131 (2014): 290-302
- Gong, Y. et al., *Adv.Anat.Pathol.* 21 (2014): 191-200
- Gonzalez, J. E. et al., *J Am.Acad.Audiol.* 25 (2014): 253-260
- Goode, G. et al., *PLoS.One.* 9 (2014): e100103
- Granja, S. et al., *Oncotarget.* 6 (2015): 6708-6721
- 60 Green, M. R. et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* 4th (2012)

- Greenfield, E. A., *Antibodies: A Laboratory Manual* 2nd (2014)
- Griffith, O. L. et al., *J Clin.Oncol.* 24 (2006): 5043-5051
- Grunewald, T. G. et al., *Biol.Cell* 105 (2013): 535-547
- Guerrero-Preston, R. et al., *Epigenetics.* 9 (2014): 1031-1046
- 5 Guo, P. et al., *Onco.Targets.Ther.* 8 (2015): 73-79
- Halldorsdottir, A. M. et al., *Am.J Hematol.* 87 (2012): 361-367
- Han, B. et al., *Mol.Cancer* 14 (2015): 64
- Havens, M. A. et al., *PLoS.Genet.* 10 (2014): e1004312
- Heist, R. S. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 112 (2015): 1547-1552
- 10 Hevir-Kene, N. et al., *Chem Biol.Interact.* 234 (2015): 309-319
- Hirota, E. et al., *Int.J Oncol.* 29 (2006): 799-827
- Hlavac, V. et al., *Medicine (Baltimore)* 93 (2014): e255
- Hoffmann, N. E. et al., *Cancer* 112 (2008): 1471-1479
- Hofmann, H. S. et al., *Eur.Urol.* 48 (2005): 77-81
- 15 Hogan, L. E. et al., *Blood* 118 (2011): 5218-5226
- Holti, L. et al., *Clin.Cancer Res.* 8 (2002): 3369-3376
- Honke, K. et al., *J Biochem.* 119 (1996): 421-427
- Hovnanian, A., *Subcell.Biochem.* 45 (2007): 337-363
- Hu, C. A. et al., *FEBS Lett.* 586 (2012): 947-955
- 20 Hu, M. et al., *J Surg.Oncol* 108 (2013): 192-196
- Hu, S. et al., *J Cancer Res Clin Oncol* 140 (2014): 883-893
- Hu, Y. et al., *Mol.Cancer Ther.* 14 (2015): 289-297
- Hua, D. et al., *Int.J Mol Med.* 30 (2012): 1267-1274
- Huang, C. N. et al., *Ann.Oncol* 23 (2012a): 707-713
- 25 Huang, G. et al., *J Surg.Oncol* 105 (2012b): 420-424
- Huang, Y. et al., *Cell Biosci.* 3 (2013): 16
- Hung, T. H. et al., *Int.J Biochem.Cell Biol.* 53 (2014): 55-65
- Hunt, J. D. et al., *Int.J Cancer* 114 (2005): 101-108
- Hwang, M. L. et al., *J Immunol.* 179 (2007): 5829-5838
- 30 Ilm, K. et al., *Mol.Cancer* 14 (2015): 38
- Inoue, Y. et al., *Cancer Chemother.Pharmacol.* (2015)
- Inzelberg, R. et al., *Neurology* 78 (2012): 781-786
- Ishiguro, Y. et al., *Gan* 75 (1984): 53-60
- Jeng, Y. M. et al., *Br.J Surg.* 96 (2009): 66-73
- 35 Jensen, D. H. et al., *J Oral Pathol.Med.* (2014)
- Jiang, J. G. et al., *Cancer Res* 65 (2005): 4707-4715
- Jiao, J. et al., *Cancer Lett.* 320 (2012): 96-103
- Jin, Z. et al., *Anticancer Res.* 33 (2013): 5199-5203
- Joerger, M. et al., *Prostate Cancer Prostatic.Dis.* 18 (2015): 167-172
- 40 Johnson, R. H. et al., *Oncotarget.* (2015)
- Jose-Eneriz, E. S. et al., *Br.J Haematol.* 142 (2008): 571-582
- Jung, G. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1987): 4611-4615
- Junnala, S. et al., *BMC.Cancer* 10 (2010): 73
- Kamphausen, E. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* 59 (2010): 1273-1284
- 45 Kang, M. R. et al., *J Pathol.* 217 (2009): 702-706
- Karagiannis, G. S. et al., *Mol.Oncol* 8 (2014): 1240-1252
- Kato, M. et al., *Oncol Rep.* 13 (2005): 367-370
- Kawahara, R. et al., *PLoS.One.* 9 (2014): e115004
- Kawakami, K. et al., *Int.J Oncol* (2015)
- 50 Khan, R. et al., *Clin.Proteomics.* 10 (2013a): 6
- Khan, Z. et al., *Cancer Invest* 31 (2013b): 404-411
- Kibbe, A. H., *Handbook of Pharmaceutical Excipients* rd (2000)
- Kim, J. H. et al., *J Korean Med.Sci.* 8 (1993): 68-72
- Kim, J. S. et al., *Cancer Biol.Ther.* 13 (2012): 638-646
- 55 Kim, M. et al., *Mol Cancer Res* 6 (2008): 222-230
- Kirov, A. et al., *J Cell Biochem.* (2015)
- Kleiber, K. et al., *Anticancer Res.* 27 (2007): 55-61
- Kobayashi, H. et al., *Oncol Lett.* 10 (2015): 612-618
- Koh, J. et al., *Mol.Endocrinol.* 25 (2011): 867-876
- 60 Komatsu, S. et al., *Br.J Cancer* 112 (2015): 357-364

- Konno, R., *Hum.Cell* 14 (2001): 261-266
- Koo, J. S. et al., *Am.J Clin Pathol.* 143 (2015): 584-592
- Korosec, B. et al., *Cancer Genet.Cytogenet.* 171 (2006): 105-111
- Koshikawa, K. et al., *Oncogene* 21 (2002): 2822-2828
- 5 Krieg, A. M., *Nat Rev.Drug Discov.* 5 (2006): 471-484
- Kuang, S. Q. et al., *Leukemia* 22 (2008): 1529-1538
- Kubota, H. et al., *Cell Stress.Chaperones.* 15 (2010): 1003-1011
- Kumps, C. et al., *PLoS.One.* 8 (2013): e52321
- Kwon, J. et al., *Int J Oncol* 43 (2013): 1523-1530
- 10 Lai, K. K. et al., *PLoS.Genet.* 7 (2011): e1002147
- Lai, Y. J. et al., *Mol.Cell Biol.* 30 (2010): 5582-5596
- Lapointe, J. et al., *Endocrinology* 140 (1999): 4486-4493
- Lebdai, S. et al., *Urol.Oncol* 33 (2015): 69-8
- Lee, H. J. et al., *Oncol Lett.* 8 (2014): 1986-1992
- 15 Lee, H. K. et al., *Oncotarget.* 6 (2015): 1850-1864
- Lee, J. et al., *Yonsei Med.J* 54 (2013): 1158-1167
- Li, J. et al., *J Mol.Histol.* 45 (2014a): 47-57
- Li, M. et al., *Int.J Oncol.* 24 (2004): 305-312
- Li, R. et al., *Curr.Cancer Drug Targets.* 14 (2014b): 274-285
- 20 Li, W. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* 6 (2013): 2430-2440
- Li, X. X. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* 7 (2014c): 2729-2736
- Li, Y. et al., *BMC.Cancer* 15 (2015): 417
- Liddy, N. et al., *Nat Med.* 18 (2012): 980-987
- Lin, L. et al., *Oncol Lett.* 6 (2013): 740-744
- 25 Lin, M. C. et al., *Oral Oncol* 50 (2014): 478-484
- Lin, Y. W. et al., *Eur.J Cancer* 45 (2009): 2041-2049
- Lin, Z. Y. et al., *Biomed.Pharmacother.* 66 (2012): 454-458
- Liu, B. et al., *Zhonghua Fu Chan Ke.Za Zhi.* 45 (2010a): 41-44
- Liu, F. et al., *World J Surg.Oncol* 12 (2014a): 333
- 30 Liu, H. et al., *Carcinogenesis* 34 (2013): 885-892
- Liu, J. et al., *Oncotarget.* (2015)
- Liu, K. et al., *Tumour.Biol.* 35 (2014b): 995-1002
- Liu, S. et al., *Tumour.Biol.* 35 (2014c): 9897-9904
- Liu, Y. et al., *J Neurooncol.* 99 (2010b): 13-24
- 35 Liu, Y. et al., *Mol.Cancer* 9 (2010c): 186
- Ljungberg, B. et al., *Eur.Urol.* 60 (2011): 615-621
- Ljunggren, H. G. et al., *J Exp.Med.* 162 (1985): 1745-1759
- Longenecker, B. M. et al., *Ann N.Y.Acad.Sci.* 690 (1993): 276-291
- Lourenco, G. J. et al., *Breast Cancer Res Treat.* 100 (2006): 335-338
- 40 Lu, Y. Y. et al., *Zhongguo Shi Yan.Xue.Ye.Xue.Za Zhi.* 22 (2014): 1336-1340
- Lukas, T. J. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 78 (1981): 2791-2795
- Lundblad, R. L., *Chemical Reagents for Protein Modification* 3rd (2004)
- Lung, H. L. et al., *Int.J Cancer* 127 (2010): 304-312
- Lustosa, S. A. et al., *ScientificWorldJournal.* 2014 (2014): 102541
- 45 Lv, Z. et al., *Tumour.Biol.* 35 (2014): 10497-10502
- Ma, G. F. et al., *Eur.Rev.Med.Pharmacol.Sci.* 19 (2015): 578-585
- Ma, J. et al., *Pathol.Oncol Res* 19 (2013): 821-832
- Mak, A. B. et al., *J Mol.Biol.* 426 (2014): 2175-2182
- Malik, M. A. et al., *Mol.Biol.Rep.* 39 (2012): 9095-9104
- 50 Marten, A. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* 51 (2002): 637-644
- Martinez-Lopez, N. et al., *Gastroenterology* 143 (2012): 787-798
- Massari, F. et al., *Cancer Treat.Rev.* 41 (2015): 114-121
- Masugi, Y. et al., *Lab Invest* 95 (2015): 308-319
- Matsubara, J. et al., *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 20 (2011): 2195-2203
- 55 Mehta, A. M. et al., *Immunogenetics* 67 (2015): 267-275
- Mei, J. et al., *Oncogene* 25 (2006): 849-856
- Mertens-Walker, I. et al., *BMC.Cancer* 15 (2015): 164
- Meziere, C. et al., *J Immunol* 159 (1997): 3230-3237
- Michael, A. et al., *Lancet Oncol.* 4 (2003): 215-223
- 60 Minami, T. et al., *Int.Immunopharmacol.* 20 (2014): 59-65

- Minchenko, O. H. et al., *World J Gastroenterol.* 20 (2014): 13705-13717
- Miyoshi, N. et al., *Oncol Rep.* 23 (2010): 505-510
- Mo, Y. et al., *Cancer Lett.* 323 (2012): 147-154
- Moch, H., *Semin.Cancer Biol.* 23 (2013): 3-9
- 5 Mochizuki, S. et al., *Cancer Sci.* 98 (2007): 621-628
- Mohelnikova-Duchonova, B. et al., *Cancer Chemother.Pharmacol.* 72 (2013a): 669-682
- Mohelnikova-Duchonova, B. et al., *Pancreas* 42 (2013b): 707-716
- Molina-Pinelo, S. et al., *PLoS.One.* 9 (2014): e90524
- Morgan, R. A. et al., *Science* 314 (2006): 126-129
- 10 Mori, M. et al., *Transplantation* 64 (1997): 1017-1027
- Moriya, Y. et al., *Oral Oncol* 51 (2015): 84-89
- Morrissey, J. J. et al., *Urology* 83 (2014): 256-14
- Mortara, L. et al., *Clin Cancer Res.* 12 (2006): 3435-3443
- Motzer, R. J. et al., *Clin.Cancer Res.* 10 (2004): 6302S-6303S
- 15 Moutinho, C. et al., *J Natl.Cancer Inst.* 106 (2014): djt322
- Mueller, L. N. et al., *J Proteome.Res* 7 (2008): 51-61
- Mueller, L. N. et al., *Proteomics.* 7 (2007): 3470-3480
- Mukai, M. et al., *Am.J Surg.Pathol.* 10 (1986): 212-218
- Mumberg, D. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96 (1999): 8633-8638
- 20 Mustafa, D. A. et al., *Gene Regul.Syst.Bio* 4 (2010): 103-107
- Nagy, Z. et al., *Mol.Cancer* 13 (2014): 96
- Nakai, Y. et al., *J Cancer Res.Clin Oncol* 141 (2015): 933-939
- Narjuz, C. et al., *PLoS.One.* 9 (2014): e95532
- Narkiewicz, J. et al., *Oncol Rep.* 21 (2009): 1529-1537
- 25 Naryzhnyi, S. N. et al., *Biomed.Khim.* 60 (2014): 308-321
- Ng, K. T. et al., *Mol.Cancer* 13 (2014): 196
- Nguyen, H. et al., *J Biol.Chem* 290 (2015): 13641-13653
- Ni, I. B. et al., *Hematol.Rep.* 4 (2012): e19
- Nikitovic, D. et al., *Biochim.Biophys.Acta* 1840 (2014): 2471-2481
- 30 Nimptsch, K. et al., *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 18 (2009): 49-56
- Nishio, S. et al., *Cancer Lett.* 264 (2008): 36-43
- Notaridou, M. et al., *Int.J Cancer* 128 (2011): 2063-2074
- Nowak, D. et al., *Blood* 115 (2010): 1049-1053
- Oka, K. et al., *Lab Invest* 60 (1989): 38-44
- 35 Okudela, K. et al., *PLoS.One.* 9 (2014): e87193
- Olesen, S. H. et al., *Mol Cell Proteomics.* 4 (2005): 534-544
- Ozawa, D. et al., *Ann.Surg.Oncol* (2014)
- Paradis, V. et al., *Gut* 62 (2013): 911-919
- Pathan, N. et al., *J Biol.Chem* 276 (2001): 32220-32229
- 40 Pavlikova, N. et al., *Exp.Cell Res.* 333 (2015): 1-10
- Pedersen, M. O. et al., *Leuk.Lymphoma* 51 (2010): 314-328
- Penning, T. M., *Chem Res.Toxicol.* 27 (2014): 1901-1917
- Pereira, P. M. et al., *Org.Biomol.Chem.* 12 (2014): 1804-1811
- Peters, D. G. et al., *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 14 (2005): 1717-1723
- 45 Petrini, I., *Ann.Transl.Med.* 3 (2015): 82
- Pinheiro, J. et al., *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models* (<http://CRAN.R-project.org/package=nlme>) (2015)
- Planutis, K. et al., *J Transl.Med.* 11 (2013): 50
- Plebanski, M. et al., *Eur.J Immunol* 25 (1995): 1783-1787
- 50 Porta, C. et al., *Virology* 202 (1994): 949-955
- Prakash, S. et al., *J Pediatr.Hematol.Oncol* 27 (2005): 179-187
- Principe, M. et al., *Oncotarget.* 6 (2015): 11098-11113
- Qian, Z. et al., *Chem Biol.Interact.* 184 (2010): 50-57
- Quinn, M. C. et al., *Int J Oncol* 42 (2013): 912-920
- 55 Ragnum, H. B. et al., *Int.J Radiat.Oncol Biol.Phys.* 87 (2013): 753-760
- Ramazzotti, G. et al., *Crit Rev.Eukaryot.Gene Expr.* 21 (2011): 291-301
- Rammensee, H. G. et al., *Immunogenetics* 50 (1999): 213-219
- RefSeq, The NCBI handbook [Internet], Chapter 18, (2002), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21091/>
- 60 Rehfeld, A. et al., *Front Endocrinol.(Lausanne)* 5 (2014): 46

- Ren, Y. et al., *Mol.Cell Proteomics*. 13 (2014): 3126-3137
- Renehan, A. G. et al., *Int.J Cancer* 126 (2010): 692-702
- Renehan, A. G. et al., *Lancet* 371 (2008): 569-578
- Renkvist, N. et al., *Cancer Immunol.Immunother*. 50 (2001): 3-15
- 5 Richardson, A. et al., *Crit Rev.Oncog*. 18 (2013): 409-434
- Rini, B. I. et al., *Curr.Opin.Oncol*. 20 (2008): 300-306
- Rini, B. I. et al., *Cancer* 107 (2006): 67-74
- Rock, K. L. et al., *Science* 249 (1990): 918-921
- Rocken, C. et al., *Pathologe* 33 Suppl 2 (2012): 235-240
- 10 Rodenko, B. et al., *Nat Protoc*. 1 (2006): 1120-1132
- Royds, J. A. et al., *J Clin Pathol*. 38 (1985): 1258-1260
- Ruiz-Martinez, J. et al., *Mov Disord*. 29 (2014): 750-755
- Sachdeva K et al., <http://emedicine.medscape.com/article/281340-overview> (2010)
- Sahasrabudde, N. A. et al., *Biochem.Biophys.Res.Comm*. 446 (2014): 863-869
- 15 Saiki, R. K. et al., *Science* 239 (1988): 487-491
- Sakamoto, L. H. et al., *Leuk.Res*. 38 (2014): 496-502
- Sasnauskiene, A. et al., *Medicina (Kaunas)* 50 (2014): 14-18
- Sato, T. et al., *PLoS.One*. 8 (2013): e59444
- Schlomann, U. et al., *Nat Commun*. 6 (2015): 6175
- 20 Schuetz, A. N. et al., *J Mol.Diagn*. 7 (2005): 206-218
- Schumann, T. et al., *Oncotarget*. (2015)
- Scrideli, C. A. et al., *Leuk.Res*. 34 (2010): 32-37
- Sedlakova, I. et al., *Int.J Gynecol.Cancer* 25 (2015): 236-243
- Seeger, F. H. et al., *Immunogenetics* 49 (1999): 571-576
- 25 Seong, J. et al., *Mol.Biol.Rep*. 39 (2012): 3597-3601
- Sethakorn, N. et al., *J Recept.Signal.Transduct.Res*. 33 (2013): 166-171
- Sherman, F. et al., *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics* (1986)
- Shu, J. et al., *Cancer Res*. 66 (2006): 5077-5084
- Shukla, S. et al., *Cancer Res*. 73 (2013): 6563-6573
- 30 Sieuwerts, A. M. et al., *Clin.Chem* 53 (2007): 1280-1288
- Sigari, N. et al., *Clin Lab* 60 (2014): 23-27
- Silva, L. P. et al., *Anal.Chem*. 85 (2013): 9536-9542
- Singh, S. et al., *Tumour.Biol*. (2014)
- Singh-Jasuja, H. et al., *Cancer Immunol.Immunother*. 53 (2004): 187-195
- 35 Slater, E. P. et al., *Transl.Oncol*. 6 (2013): 99-103
- Small, E. J. et al., *J Clin Oncol*. 24 (2006): 3089-3094
- Song, J. et al., *PLoS.One*. 9 (2014): e110074
- Sowalsky, A. G. et al., *Mol.Cancer Res*. 13 (2015): 98-106
- Sprowl, J. A. et al., *Clin Pharmacol.Ther*. 94 (2013): 585-592
- 40 Staal-Viliare, A. et al., *Leuk.Lymphoma* 48 (2007): 439-441
- Staepli, F. et al., *J Immunol*. 188 (2012): 3820-3828
- Stamatopoulos, K. et al., *Blood* 106 (2005): 3575-3583
- Stein, U., *Expert.Opin.Ther.Targets*. 17 (2013): 1039-1052
- Steinway, S. N. et al., *PLoS.One*. 10 (2015): e0128159
- 45 Stoehr, C. G. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol*. 6 (2013): 998-1008
- Strekalova, E. et al., *Clin.Cancer Res*. (2015)
- Sturm, M. et al., *BMC.Bioinformatics*. 9 (2008): 163
- Su, H. et al., *J Transl.Med*. 13 (2015): 104
- Su, Z. et al., *Cancer Res*. 63 (2003): 2127-2133
- 50 Suh, K. S. et al., *Clin.Cancer Res*. 13 (2007a): 121-131
- Suh, K. S. et al., *Mol.Carcinog*. 46 (2007b): 599-604
- Suhovskih, A. V. et al., *Cell Tissue Res*. (2015)
- Sun, W. et al., *Cancer Res*. 74 (2014a): 1091-1104
- Sun, Z. et al., *J Proteome.Res* 13 (2014b): 1593-1601
- 55 Szarvas, T. et al., *Int J Cancer* 135 (2014): 1596-1604
- Taguchi, O. et al., *Clin Chim.Acta* 244 (1996): 69-81
- Tam, C. W. et al., *Endocrinology* 147 (2006): 5023-5033
- Tan, M. H. et al., *Breast Cancer Res.Treat*. 131 (2012): 849-858
- Tanaka, J. et al., *J Oral Pathol.Med*. 44 (2015): 126-133
- 60 Tanaka, T. et al., *J Cancer Res.Clin Oncol* 140 (2014): 503-513

- Tanic, N. et al., *Anticancer Res.* 26 (2006): 2137-2142
 Tashiro, A. et al., *Am.J Cancer Res.* 4 (2014): 528-536
 Teufel, R. et al., *Cell Mol Life Sci.* 62 (2005): 1755-1762
 Thiel, A. et al., *Oncol Rep.* 26 (2011): 615-620
 5 Tong, S. Y. et al., *Cancer Invest* 30 (2012): 642-645
 Tong, W. G. et al., *Epigenetics.* 5 (2010): 499-508
 Toth, K. et al., *Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol.* 22 (2014): 642-647
 Tran, E. et al., *Science* 344 (2014a): 641-645
 Tran, T. T. et al., *Photochem.Photobiol.* 90 (2014b): 1136-1143
 10 Tsourlakis, M. C. et al., *Int.J Mol.Sci.* 16 (2015): 8591-8606
 Vachani, A. et al., *Clin Cancer Res.* 13 (2007): 2905-2915
 Vasiljevic, A. et al., *Neuropathology.* 33 (2013): 149-161
 Volz, N. B. et al., *Pharmacogenomics.J* 15 (2015): 69-76
 Wake, N. C. et al., *Hum.Mutat.* 34 (2013): 1650-1661
 15 Walter, S. et al., *J Immunol* 171 (2003): 4974-4978
 Walter, S. et al., *Nat Med.* 18 (2012): 1254-1261
 Wang, B. S. et al., *Cell Stress.Chaperones.* 18 (2013a): 359-366
 Wang, D. et al., *Mol.Cell Biochem.* 396 (2014a): 67-77
 Wang, G. et al., *Tumour.Biol* 36 (2015a): 1055-1065
 20 Wang, H. et al., *J Biol.Chem* 289 (2014b): 4009-4017
 Wang, J. H. et al., *World J Gastroenterol.* 16 (2010a): 5642-5646
 Wang, L. H. et al., *Tumour.Biol.* 35 (2014c): 1157-1168
 Wang, R. et al., *Biomed.Res.Int.* 2013 (2013b): 195692
 Wang, T. P. et al., *Exp.Cell Res.* 316 (2010b): 2893-2902
 25 Wang, W. M. et al., *Mol.Med.Rep.* (2015b)
 Wang, Y. et al., *J Biol.Chem* 289 (2014d): 14225-14238
 Wang, Y. et al., *Clin.Chem Lab Med.* 48 (2010c): 1475-1479
 Wang, Y. et al., *Anticancer Res* 33 (2013c): 207-214
 Wang, Y. et al., *Pathol.Oncol Res.* 20 (2014): 611-618
 30 Wang, Z. et al., *J Cancer Res Clin Oncol* 141 (2015c): 1353-1361
 Warren, C. R. et al., *J Cell Biochem.* 115 (2014): 1322-1333
 Waugh, M. G., *Mol.Neurobiol.* (2014)
 Wei, Q. et al., *Cancer Res.* 69 (2009): 2332-2339
 Westphal, P. et al., *Am.J Clin Pathol.* 143 (2015): 248-256
 35 Wierecky, J. et al., *Cancer Res.* 66 (2006): 5910-5918
 Wikman, H. et al., *PLoS.One.* 7 (2012): e47537
 Willcox, B. E. et al., *Protein Sci.* 8 (1999): 2418-2423
 Wittig, B. et al., *Hum.Gene Ther.* 12 (2001): 267-278
 Wlodarski, M. W. et al., *J Leukoc.Biol* 83 (2008): 589-601
 40 World Cancer Report, (2014)
 World Health Organization Classification of Tumours, (2004)
 Wu, M. et al., *Oncogene* 23 (2004): 6815-6819
 Wu, Y. M. et al., *Cancer Res* 71 (2011): 7270-7279
 Xiao, L. et al., *Biochim.Biophys.Acta* (2015)
 45 Xiao, W. et al., *Mol.Med.Rep.* 10 (2014): 453-458
 Xin, Z. et al., *Virchows Arch.* 465 (2014): 35-47
 Xu, Y. et al., *J Cell Biochem.* 115 (2014): 1112-1121
 Xu, Z. et al., *Oncol Rep.* 33 (2015): 2899-2907
 Yamamoto, M. et al., *Cancer Res.* 65 (2005): 8706-8714
 50 Yan, P. et al., *Asian Pac.J Cancer Prev.* 15 (2014): 8923-8929
 Yang, C. Y. et al., *J Immunol* 192 (2014a): 1547-1557
 Yang, D. et al., *Oncogene* 30 (2011): 4590-4600
 Yang, J. et al., *J Proteomics.* 109 (2014b): 162-175
 Yang, W. et al., *Med.Oncol* 31 (2014c): 826
 55 Yang, W. et al., *Tumour.Biol.* 35 (2014d): 8267-8279
 Yano, Y. et al., *Cancer Lett.* 207 (2004): 139-147
 Yao, Y. et al., *Cell Physiol Biochem.* 35 (2015): 983-996
 Yeh, I. et al., *Nat.Commun.* 6 (2015): 7174
 Yeom, S. Y. et al., *Mol.Cancer Ther.* 13 (2014): 3049-3061
 60 Yin, Y. et al., *Tumour.Biol.* 34 (2013): 3611-3617

- Yoshida, A. et al., Hum.Cell 26 (2013): 56-66
 Yoshida, Y. et al., Anticancer Res. 32 (2012): 2301-2308
 Yu, P. H. et al., PLoS.One. 8 (2013): e82254
 Yu, Z. et al., Cancer Lett. 353 (2014): 182-193
 5 Yuan, R. H. et al., Ann Surg.Oncol 16 (2009): 1711-1719
 Zaghloul, R. A. et al., Eur.J Pharmacol. 746 (2015): 353-362
 Zamani-Ahmadmahmudi, M. et al., Electrophoresis 35 (2014): 901-910
 Zaremba, S. et al., Cancer Res. 57 (1997): 4570-4577
 Zhang, B. et al., Blood 106 (2005): 1355-1361
 10 Zhang, H. et al., Cancer Lett. 323 (2012a): 106-113
 Zhang, J. et al., Mol.Med.Rep. 10 (2014a): 749-754
 Zhang, J. et al., Xi.Bao.Yu Fen.Zi.Mian.Yi.Xue.Za Zhi. 29 (2013): 190-193
 Zhang, L. et al., Dig.Dis.Sci. 57 (2012b): 2608-2614
 Zhang, S. D. et al., Onco.Targets.Ther. 8 (2015): 835-843
 15 Zhang, X. D. et al., Int.J Clin Exp.Med. 7 (2014b): 1190-1196
 Zhao, M. et al., Cancer Invest 32 (2014): 464-469
 Zhao, M. et al., Oncotarget. (2015a)
 Zhao, Z. et al., Med.Oncol 32 (2015b): 112
 Zhen, T. et al., Oncotarget. 5 (2014): 3756-3769
 20 Zhou, J. et al., Oncol Rep. 30 (2013): 2229-2237
 Zhu, J. et al., Int.J Clin Exp.Pathol. 8 (2015): 702-710
 Zienert, E. et al., Cancer Lett. 364 (2015): 17-24
 Zietek, Z. et al., Pol.Tyg.Lek. 51 (1996): 86-88
 Zizi-Sermpetzoglou, A. et al., Eur.J Gynaecol.Oncol 35 (2014): 325-327
 25 Zu, X. Y. et al., Recent Pat Anticancer Drug Discov. 7 (2012): 154-167
 Zubor, P. et al., Mol.Biol.Rep. 42 (2015): 977-988
 Zuniga-Garcia, V. et al., Dig.Dis.Sci. (2015)
 Zurawa-Janicka, D. et al., Oncol Rep. 28 (2012): 1838-1844
 Follenzi A, et al. Nat Genet. 2000 Jun;25(2):217-22.
 30 Zufferey R, et al. J Virol. 1999 Apr;73(4):2886-92.
 Scholten KB, et al. Clin Immunol. 2006 May;119(2):135-45.
 Gustafsson C, et al. Trends Biotechnol. 2004 Jul;22(7):346-53. Review.
 Kuball, J., et al. (2007). Blood 109, 2331-2338.
 Schmitt, T. M., et al. (2009). Hum. Gene Ther. 20, 1240-1248.
 35

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТИ

<110> immatics biotechnologies GmbH

5 <120> Нові пептиди та комбінації пептидів для застосування для імунотерапії
нирковоклітинної карциноми (НKK) та інших видів раку

<130> I32806WO

10 <150> GB 1505585.8
<151> 2015-03-31

<150> US 62/140,767
15 <151> 2015-03-31

<160> 153

<170> PatentIn version 3.5

20 <210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

25 <400> 1

Ala Leu Ile Val Ser Leu Pro Tyr Leu
1 5

30 <210> 2
<211> 9
<212> PRT
35 <213> Homo sapiens

<400> 2

Ile Leu Trp Arg Glu Val Val Thr Leu
40 1 5

<210> 3
<211> 9
45 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

50 Arg Leu Leu Gly Glu Val Gln Ala Leu
1 5

<210> 4
55 <211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

60

Phe Leu Ser Gln Asp Ile Ile Thr Val
1 5

5 <210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 5

Tyr Leu Tyr Pro Asn Leu Thr Arg Leu
1 5

15 <210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 6

Val Leu Phe Glu Leu Ser Lys Thr Val
1 5

25 <210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30 <400> 7

Phe Leu Leu Ser Leu Ile Asp Arg Leu
35 1 5

40 <210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

45 Gly Leu Ala Ser Phe Lys Ser Phe Leu
1 5

50 <210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

55 Ile Leu Leu Gln Lys Pro Asp Ser Val
1 5

60 <210> 10

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 10
 Lys Leu Leu Gln Asn Asn Tyr Gly Leu
 1 5
 10
 <210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15
 <400> 11
 Phe Ile Gln Thr Glu Ala Pro Lys Glu Val
 1 5 10
 20
 <210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 Ala Leu Asp Pro Ser Gly Asn Gln Leu Ile
 30 1 5 10
 <210> 13
 <211> 9
 35 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 40 Lys Ile Met Ala Gln Ile Leu Thr Val
 1 5
 <210> 14
 45 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 50
 Ala Leu Leu Thr Glu Thr Ile Phe Leu
 1 5
 55 <210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 60 <400> 15

Ile Leu Ile Lys His Leu Val Lys Val
1 5

5
<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10
<400> 16

Phe Met Pro Glu Glu Leu Pro Gln Leu
1 5

15
<210> 17
<211> 9
<212> PRT
20 <213> Homo sapiens

<400> 17

Ile Leu Ala Gln Gln Val His Ala Leu
25 1 5

<210> 18
<211> 9
30 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

35 Tyr Val Leu Asp Leu Ala Ala Lys Val
1 5

<210> 19
40 <211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

45 Leu Leu Asp Pro Gly Ser Leu Gln Leu
1 5

50 <210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

55 <400> 20

Ala Val Ala Asn Thr Thr Phe Thr Val
1 5

60

<210> 21
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 21

 Arg Leu Ile Gln Gly Asp Gln Ile Leu Ser Val
 1 5 10
 10

 <210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

 <400> 22

 Phe Leu Ser Pro Pro Leu Pro Ser Val
 20 1 5

 <210> 23
 <211> 9
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 23

 Tyr Ile Gln Glu Val Val Gln Tyr Ile
 30 1 5

 <210> 24
 <211> 9
 35 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 24
 40
 Phe Thr Leu Gly Thr Thr Val Phe Leu
 1 5

 45 <210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 50 <400> 25

 Leu Leu Val Pro Ala His Leu Val Ala Ala
 1 5 10
 55
 <210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 60

<400> 26
 Ser Leu Met Glu Ile Leu Tyr Thr Leu
 1 5
 5
 <210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 27
 Ser Leu Ser Asp Leu Leu Val Ser Leu
 15 1 5
 <210> 28
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 28
 25 Phe Ile Ala Asp Leu Val Val Gly Leu
 1 5
 <210> 29
 30 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 29
 35 Ile Leu Leu Asp Leu Glu Gln Ala Leu
 1 5
 40 <210> 30
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 30
 Gln Leu Phe Tyr Thr Lys Ile Phe Leu
 1 5
 50 <210> 31
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 55 <400> 31
 Val Leu Phe Gly Leu Asp Pro Ala Val Ile Lys Val
 1 5 10
 60

<210> 32
 <211> 11
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 32

 Phe Leu Ala Gly Gly Ile Arg Gly Ser Gly Ala
 10 1 5 10

 <210> 33
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 33

 Phe Ile Ala Asp Val Val Glu Lys Ile
 20 1 5

 <210> 34
 25 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 34
 30
 Glu Leu Asn Asn Gln Asn Phe Tyr Leu
 1 5

 35 <210> 35
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 40 <400> 35

 Val Leu His Ser Leu Gln Thr Gln Leu
 1 5

 45
 <210> 36
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50
 <400> 36

 Ser Leu Phe Gly Lys Lys Tyr Ile Leu
 1 5
 55

 <210> 37
 <211> 9
 <212> PRT
 60 <213> Homo sapiens

<400> 37

5 Val Leu Ala Pro Val Ile Leu Met Leu
1 5

<210> 38
<211> 9
10 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38

15 Val Leu Leu Asp Thr Ile Leu Gln Leu
1 5

<210> 39
20 <211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39

25 Tyr Leu Leu Asn Leu Asn His Leu Gly Leu
1 5 10

30 <210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35 <400> 40

Tyr Ile Gln Glu His Leu Leu Gln Ile
1 5

40 <210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

45 <400> 41

Gly Leu Leu Lys Thr Leu Gln Lys Leu
1 5

50 <210> 42
<211> 10
<212> PRT
55 <213> Homo sapiens

<400> 42

60 Val Ile Leu Asp Thr Gly Thr Ile Gln Leu
1 5 10

5 <210> 43
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 43
 10 Tyr Leu Lys Asp Glu Leu Asp Glu Leu
 1 5

 15 <210> 44
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 44
 20 Ala Leu Phe Ser Phe Val Thr Ala Leu
 1 5

 25 <210> 45
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 30 <400> 45

 Ala Leu Leu Gly Ile Pro Leu Thr Leu
 1 5

 35 <210> 46
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 46

 Gly Leu Ser Glu Val Leu Val Gln Ile
 1 5
 45

 <210> 47
 <211> 11
 <212> PRT
 50 <213> Homo sapiens

 <400> 47

 Thr Leu Ala Glu Val Arg Ala Val Gln Glu Ile
 55 1 5 10

 <210> 48
 <211> 9
 60 <212> PRT

<213> Homo sapiens
 <400> 48
 5 Val Val Ala Ser Asn Ile Met Glu Val
 1 5
 <210> 49
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 49
 15 Val Leu Ile Val Glu Val Pro Gly Val
 1 5
 20 <210> 50
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 50
 Ser Leu Ser Asp His Ile Val Leu Leu
 1 5
 30 <210> 51
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 51
 Asn Leu Trp Pro Met Ile Leu Thr Leu
 1 5
 40 <210> 52
 <211> 9
 <212> PRT
 45 <213> Homo sapiens
 <400> 52
 Ser Ile Leu Asp Ala Val Gln Arg Val
 50 1 5
 <210> 53
 <211> 9
 55 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 53
 60 Phe Leu Leu Glu Ile Arg Gln Thr Leu

1 5

5 <210> 54
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 54
 Ala Leu Val Ala Lys Gly Leu Val Gln Ala
 1 5 10

15 <210> 55
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 55
 Tyr Leu Ala Leu Ile Leu Pro Val Leu
 1 5

25 <210> 56
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 56
 Ile Leu Met Asp Phe Ser Asn Ser Met
 1 5

35 <210> 57
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <400> 57
 Ser Leu Gln Lys Glu Ile Leu Tyr Leu
 1 5

50 <210> 58
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

55 <400> 58
 Phe Leu Val Asp Phe Glu Gln Ser His Leu
 1 5 10

60 <210> 59
 <211> 9

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 59
 5 Ser Leu Lys Asn Asn Val Val Ser Val
 1 5

 10 <210> 60
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 15 <400> 60
 Ile Leu Trp Lys Asp Ile Glu Tyr Val
 1 5

 20 <210> 61
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 61
 Ser Leu Met Gly Ile Leu Leu Arg Ile
 1 5
 30
 <210> 62
 <211> 11
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 62
 Val Leu Ala Gly Pro Ala Phe Leu Val Gln Leu
 40 1 5 10

 <210> 63
 <211> 11
 45 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 63
 50 Gly Leu Ile Glu Asp His Phe Asp Val Thr Val
 1 5 10

 <210> 64
 55 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 64
 60

Leu Leu Ala Ala Ser Val Ala Leu Ala
1 5

5 <210> 65
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 65

Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Val Thr Gly Ala
1 5 10

15 <210> 66
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 66

Thr Leu Leu Lys Thr Ile Ile Lys Val
1 5

25 <210> 67
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30 <400> 67

Leu Leu Asp Val Leu Ala Pro Leu Val
1 5

35 <210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

40 <400> 68

45 Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val
1 5

50 <210> 69
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

55 <400> 69

Ile Leu Ala Asp Leu Leu Pro Ser Leu
1 5

60 <210> 70

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 70
 Ser Leu Thr Ala Leu Arg Leu Leu Leu
 1 5
 10
 <210> 71
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15
 <400> 71
 Ala Leu Asp Gly His Leu Tyr Ala Val
 1 5
 20
 <210> 72
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 72
 Tyr Ser Leu Glu Lys Val Phe Gly Ile
 30 1 5
 <210> 73
 <211> 9
 35 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 73
 40 Gly Leu Asp Gly Ile Pro Phe Thr Val
 1 5
 <210> 74
 45 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 74
 50 Gly Leu Phe His Lys Gln Val Thr Val
 1 5
 55 <210> 75
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 60 <400> 75

Phe Leu Ile Lys Ser Ile Asn Leu Val
 1 5
 5
 <210> 76
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 10
 <400> 76
 Val Leu Ala Asp Asp His Leu Ile Glu Val
 1 5 10
 15
 <210> 77
 <211> 9
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 77
 Ser Leu Ile Lys His Lys Ile Met Leu
 25 1 5
 <210> 78
 <211> 9
 30 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 78
 35 Ala Leu Leu Asp Thr Val Val Gln Ala
 1 5
 <210> 79
 40 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 79
 45 Ala Leu Ala Asp Ile Val Trp Arg Ala
 1 5
 50 <210> 80
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 55 <400> 80
 Lys Leu Ala Ser Met Leu Glu Thr Leu
 1 5
 60

<210> 81
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 81
 Ser Leu Leu Pro Ala Leu Pro Lys Leu
 1 5
 10
 <210> 82
 <211> 11
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 82
 Ser Leu Leu Gln Ala Thr Asp Phe Met Ser Leu
 20 1 5 10
 <210> 83
 <211> 9
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 83
 30 Ile Gln Trp Ser Ile Val Pro Glu Val
 1 5
 <210> 84
 <211> 9
 35 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 84
 40 Tyr Leu Met Asp Glu Gly Ala His Leu
 1 5
 45 <210> 85
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 85
 Phe Val Met Ser Glu Ile Arg Thr Val
 1 5
 55 <210> 86
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 60

<400> 86
 Gly Leu Leu Gln Gly Lys Leu Ala Leu Leu
 1 5 10
 5
 <210> 87
 <211> 8
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 87
 Leu Ala Asp Gly Val Gln Lys Val
 15 1 5
 <210> 88
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 88
 25 Thr Leu Ala Glu Leu His Ile Ser Leu
 1 5
 <210> 89
 30 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 89
 35 Ser Leu Leu Leu Ala Val Thr Glu Val
 1 5
 40 <210> 90
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 90
 Phe Thr Leu Glu Lys Asn Phe Val Ile
 1 5
 50 <210> 91
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 55 <400> 91
 Met Leu Leu Ser Ser Leu Val Ser Leu
 1 5
 60

<210> 92
 <211> 9
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 92

 Phe Leu Phe Arg Asp Ile Leu Glu Leu
 10 1 5

 <210> 93
 <211> 10
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 93

 Gly Val Met Ala Gly Asp Ile Tyr Ser Val
 20 1 5 10

 <210> 94
 25 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 94
 30
 Ile Leu His His Lys Val Tyr Asp Leu
 1 5

 35 <210> 95
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 40 <400> 95

 Lys Leu Thr Asp Val Gly Ile Ala Thr Leu
 1 5 10

 45
 <210> 96
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50
 <400> 96

 Thr Leu Ala Glu Thr Leu Val Asn Leu
 1 5
 55

 <210> 97
 <211> 9
 <212> PRT
 60 <213> Homo sapiens

<400> 97
 Thr Leu Ile Ser Glu Leu Val Gln Ala
 5 1 5

 <210> 98
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 98
 15 Lys Ile Pro Pro Val Ser Pro Ser Ile
 1 5

 <210> 99
 20 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 99
 25 Gly Leu Ala Pro His Leu Glu Gln Ile
 1 5

 30 <210> 100
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 35 <400> 100
 Lys Leu Asn Val Ala Pro Leu Ala Val
 1 5

 40 <210> 101
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 101
 His Ile Tyr Asp Lys Ala Phe Ile Thr Val
 1 5 10
 50

 <210> 102
 <211> 9
 <212> PRT
 55 <213> Homo sapiens

 <400> 102
 Leu Leu Phe Asp Val His Thr Thr Leu
 60 1 5

5 <210> 103
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 103
 10 Lys Leu Gln Asp Gly Leu Leu His Ile
 1 5

 15 <210> 104
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 104
 20 Ala Leu Phe Glu Gly Val Val Arg Gln Ile
 1 5 10

 25 <210> 105
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 30 <400> 105

 Ala Leu Ala Asp Leu Asp Glu Leu Leu Ile Arg Ala
 1 5 10

 35 <210> 106
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 40 <400> 106

 Val Leu Met Asp Leu Lys Ala Leu Leu
 1 5
 45

 <210> 107
 <211> 10
 <212> PRT
 50 <213> Homo sapiens

 <400> 107

 Val Leu Met Asp Leu Lys Ala Leu Leu Leu
 55 1 5 10

 <210> 108
 <211> 9
 60 <212> PRT

<213> Homo sapiens
 <400> 108
 5 Val Leu Ile Ser Val Leu Gln Ala Ile
 1 5
 <210> 109
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 109
 15 Tyr Leu Trp Ser Arg Val Glu Lys Leu
 1 5
 20 <210> 110
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 110
 Leu Leu Asp Leu His Ser Tyr Leu Leu
 1 5
 30 <210> 111
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 111
 Thr Leu Leu Glu Thr Glu Met Leu Leu
 1 5
 40 <210> 112
 <211> 11
 <212> PRT
 45 <213> Homo sapiens
 <400> 112
 Leu Leu Phe Asp His Leu Glu Pro Ile Glu Leu
 50 1 5 10
 <210> 113
 <211> 9
 55 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 113
 60 Ser Leu Phe Asp Trp Asn Val Lys Leu

1 5

5 <210> 114
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 114
 Ala Leu Ala Val Asn Ile Ser Ala Ala
 1 5

15 <210> 115
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 115
 Leu Leu Asp Pro Lys Thr Ile Phe Leu
 1 5

25 <210> 116
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 116
 Gly Leu Val Asp Ile Met Val His Leu
 1 5

35 <210> 117
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <400> 117
 Val Leu Phe Gly Glu Leu Pro Ala Leu
 1 5

45 <210> 118
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

50 <400> 118
 Phe Leu Asn Ala Ile Glu Thr Ala Leu
 1 5

60 <210> 119
 <211> 9

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 119
 5 Arg Leu His Asp Glu Asn Ile Leu Leu
 1 5

 10 <210> 120
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 15 <400> 120
 Gly Leu Ala Gly Asp Asn Ile Tyr Leu
 1 5

 20 <210> 121
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 121
 Ala Leu Leu Arg Thr Val Val Ser Val
 1 5
 30
 <210> 122
 <211> 9
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 122
 Ser Leu Asp Pro Ser Ser Pro Gln Val
 40 1 5

 <210> 123
 <211> 9
 45 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 123
 50 Tyr Val Asp Pro Val Ile Thr Ser Ile
 1 5

 <210> 124
 55 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 124
 60

Ile Leu Ser Pro Leu Ser Val Ala Leu
1 5

5 <210> 125
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 125

Lys Leu Asp Pro Thr Lys Thr Thr Leu
1 5

15 <210> 126
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 126

Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val
1 5

25 <210> 127
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30 <400> 127

Val Leu Ala Pro Leu Phe Val Tyr Leu
35 1 5

40 <210> 128
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 128

45 Tyr Leu Glu Glu Asp Val Tyr Gln Leu
1 5

50 <210> 129
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 129

55 Val Leu Ala Pro Arg Val Leu Arg Ala
1 5

60 <210> 130

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 130
 Ala Leu Pro Thr Val Leu Val Gly Val
 1 5
 10
 <210> 131
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15
 <400> 131
 Val Met Ala Gly Asp Ile Tyr Ser Val
 1 5
 20
 <210> 132
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 132
 Ser Val Ala Ser Thr Ile Thr Gly Val
 30 1 5
 <210> 133
 <211> 9
 35 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 133
 40 Gln Leu Ile Asp Tyr Glu Arg Gln Leu
 1 5
 <210> 134
 45 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 134
 50 Val Ala Asp Lys Ile His Ser Val
 1 5
 55 <210> 135
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 60 <400> 135

Val Val Asp Glu Gly Pro Thr Gly Val
1 5

5
<210> 136
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10
<400> 136

Tyr Gln Asp Pro His Ser Thr Ala Val
1 5

15
<210> 137
<211> 9
<212> PRT
20 <213> Homo sapiens

<400> 137

Thr Leu Val Ala Ile Val Val Gly Val
25 1 5

<210> 138
<211> 9
30 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 138

35 Ser Leu Asp Thr Leu Met Thr Tyr Val
1 5

<210> 139
40 <211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 139

45 Ile Leu Asn Val Asp Gly Leu Ile Gly Val
1 5 10

50 <210> 140
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

55 <400> 140

Ser Leu Ala Asn Asn Val Thr Ser Val
1 5

60

<210> 141
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 141
 Leu Leu Val Asp Asp Ser Phe Leu His Thr Val
 1 5 10
 10
 <210> 142
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 142
 Ser Val Asp Val Ser Pro Pro Lys Val
 20 1 5
 <210> 143
 <211> 10
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 143
 30 Ala Leu Phe Val Arg Leu Leu Ala Leu Ala
 1 5 10
 <210> 144
 <211> 10
 35 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 144
 40 Arg Leu Leu Asp Val Leu Ala Pro Leu Val
 1 5 10
 45 <210> 145
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 145
 Ser Leu His Phe Leu Ile Leu Tyr Val
 1 5
 55 <210> 146
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 60

<400> 146

Lys Leu Ile Asp Leu Ser Gln Val Met Tyr Leu
 1 5 10

5

<210> 147
 <211> 11
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens

<400> 147

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

15

<210> 148
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 148

25 Lys Leu Leu Thr Glu Val His Ala Ala
 1 5

<210> 149
 30 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 149

35 Ser Ile Leu Thr Ile Glu Asp Gly Ile Phe Glu Val
 1 5 10

40 <210> 150
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45 <400> 150

Thr Leu Met Pro Asn Ile Asn Lys Leu
 1 5

50

<210> 151
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

55

<400> 151

Tyr Met Tyr Glu Gly Pro Ala Pro Arg Ile
 1 5 10

60

<210> 152
 <211> 10
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 152

 Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
 10 1 5 10

 <210> 153
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 153

 Tyr Leu Leu Pro Ala Ile Val His Ile
 20 1 5

25

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Пептид, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 12, або його фармацевтично прийнятна сіль, причому згаданий пептид здатний зв'язуватися з молекулою головного комплексу гістосумісності (МНС) людини I класу.
2. Т-клітинний рецептор (ТКР), що реагує з лігандом HLA, який складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 12.
3. Т-клітинний рецептор за п. 2, у якому зазначений ліганд є частиною комплексу пептид-МНС.
4. Т-клітинний рецептор за п. 2 або 3, який є розчинним або зв'язаним з мембраною.
5. Т-клітинний рецептор за будь-яким з пп. 2-4, який має додаткову ефекторну функцію, таку як імуностимулюючий домен або токсин.
6. Нуклеїнова кислота, що кодує пептид за п. 1 або ТКР за будь-яким з пп. 2-5.
7. Нуклеїнова кислота за п. 6, яка зв'язана з гетерологічною послідовністю промотору, або вектор експресії, що здатний експресувати згадану нуклеїнову кислоту.
8. Рекombінантна клітина-хазяїн, що містить пептид за п. 1, нуклеїнову кислоту або вектор експресії за п. 6 або 7.
9. Рекombінантна клітина-хазяїн за п. 8, яка є антигенпрезентуючою клітиною, переважно дендритною клітиною, Т-клітиною або NK-клітиною.
10. Спосіб отримання пептиду за п. 1, що включає культивування рекombінантної клітини-хазяїна за п. 8 або 9, яка презентує пептид за п. 1 або експресує нуклеїнову кислоту або вектор експресії за п. 6 або 7, і виділення згаданого пептиду з клітини-хазяїна або її культурального середовища.
11. Спосіб отримання Т-клітинного рецептора за будь-яким з пп. 2-5, що включає культивування рекombінантної клітини-хазяїна за п. 8 або 9, яка презентує пептид за п. 1 або експресує нуклеїнову кислоту або вектор експресії за п. 6 або 7, і виділення згаданого Т-клітинного рецептора з клітини-хазяїна або її культурального середовища.
12. Активована Т-клітина, одержана способом, який включає контактування *in vitro* Т-клітин з навантаженими антигенами молекулами МНС людини I або II класу, експресованими на поверхні придатної антигенпрезентуючої клітини, протягом періоду часу, достатнього для активації згаданих Т-клітин шляхом набуття ними специфічності до антигену, де згаданий антиген є пептидом за п. 1, причому активована Т-клітина селективно розпізнає клітину, що презентує поліпептид, що містить амінокислотну послідовність, визначену за п. 1.
13. Застосування пептиду за п. 1, ТКР за будь-яким з пп. 2-5, нуклеїнової кислоти або вектора експресії за п. 6 або 7, рекombінантної клітини-хазяїна за п. 8 або 9 або активованого Т-

лімфоцита за п. 12 у діагностиці раку, який виявляє надмірну експресію білка SEMA5B, з якого отриманий пептид з послідовністю SEQ ID NO: 12.

14. Застосування пептиду за п. 1, ТКР за будь-яким з пп. 2-5, нуклеїнової кислоти або вектора експресії за п. 6 або 7, рекомбінантної клітини-хазяїна за п. 8 або 9 або активованого Т-лімфоциту за п. 12 у лікуванні раку, який виявляє надмірну експресію білка SEMA5B, з якого отриманий пептид з послідовністю SEQ ID NO: 12.

15. Застосування пептиду за п. 1, ТКР за будь-яким з пп. 2-5, нуклеїнової кислоти або вектора експресії за п. 6 або 7, рекомбінантної клітини-хазяїна за п. 8 або 9 або активованого Т-лімфоциту за п. 12 для виробництва лікарського засобу для лікування раку, який виявляє надмірну експресію білка SEMA5B, з якого отриманий пептид з послідовністю SEQ ID NO: 12.

16. Застосування за будь-яким з пп. 13-15, у якому рак вибраний з групи, яка включає рак легень, рак головного мозку, рак шлунка, колоректальний рак, рак печінки, рак підшлункової залози, рак передміхурової залози, лейкоз, рак молочної залози, меланому, рак яєчника і рак стравоходу й інші пухлини, які виявляють надмірну експресію білка SEMA5B, з якого отриманий пептид з послідовністю SEQ ID NO: 12.

17. Фармацевтична композиція, що містить принаймні один активний інгредієнт, вибраний з групи, що включає: пептид за п. 1, ТКР за будь-яким з пп. 2-5, нуклеїнову кислоту або вектор експресії за п. 6 або 7, рекомбінантну клітину-хазяїна за п. 8 або 9 та активовану Т-клітину за п. 12, та фармацевтично прийнятний носій.

18. Фармацевтична композиція за п. 17, яка додатково містить фармацевтично прийнятні допоміжні речовини і/або стабілізатори.

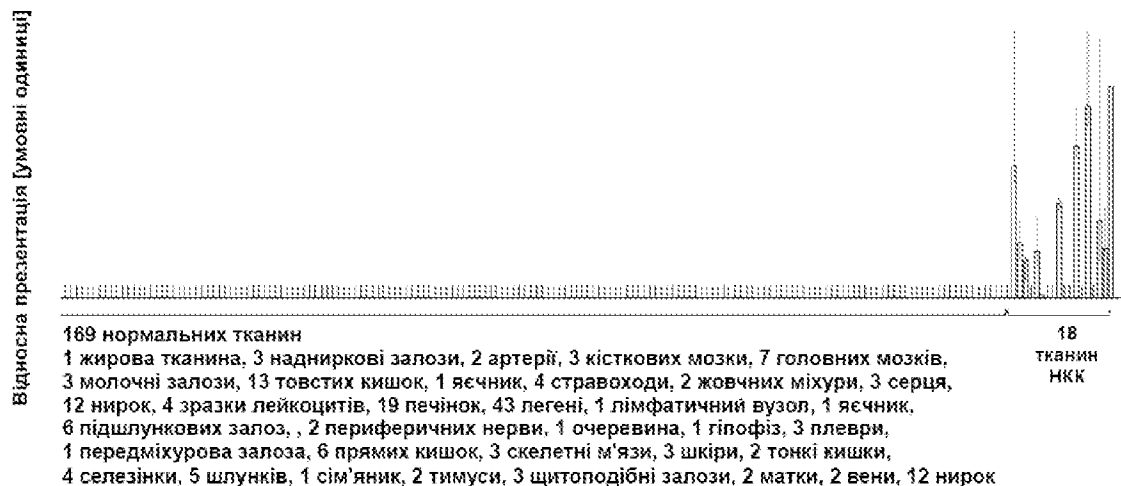
19. Терапевтичний комплект, що містить контейнер, який містить фармацевтичну композицію за п. 17 або 18 у розчині або у ліофілізованій формі.

20. Терапевтичний комплект за п. 19, який додатково містить другий контейнер, що містить розріджувач або розчин для відновлення ліофілізованої композиції.

21. Терапевтичний комплект за п. 19 або 20, який додатково містить інструкції із (i) застосування розчину або (ii) відновлення і/або застосування ліофілізованої композиції.

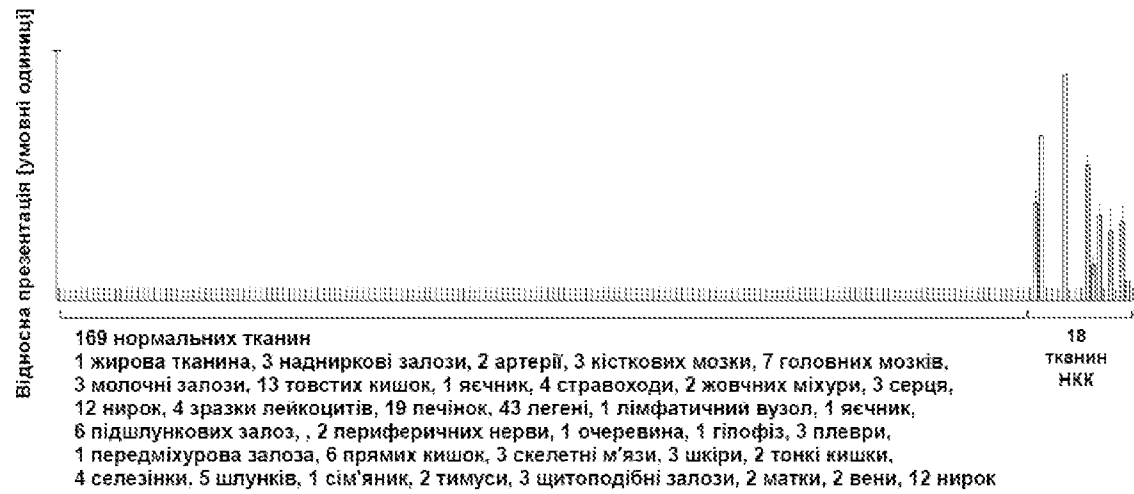
22. Терапевтичний комплект за будь-яким з пп. 19-21, який додатково містить: один або більше з (i) буфера, (ii) розчинника, (iii) фільтра, (iv) голки або (v) шприца.

Пептид: ALIVSLPYL (A*02)



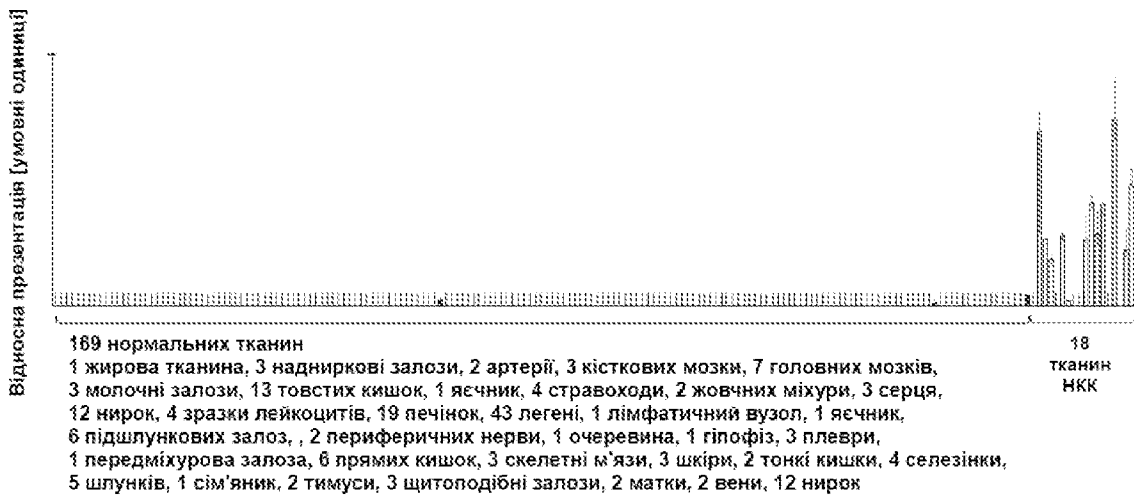
Фігура 1А

Пептид: YLEEDVYQL (A*02)



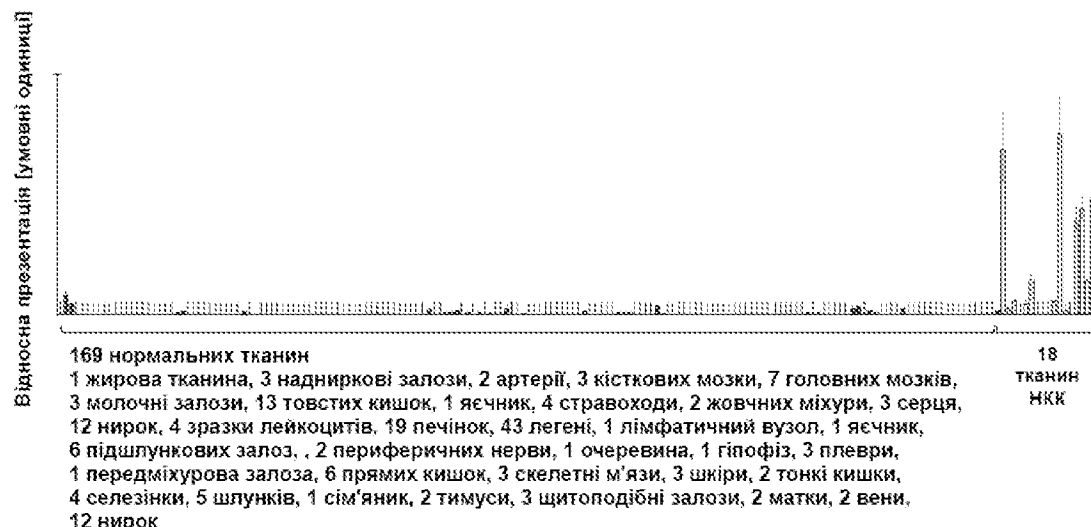
Фігура 1B

Пептид: ALDPGNGOLI (A*02)



Фігура 1C

Пептид: GLA6FK5FL (A*02)



Фігура 1D

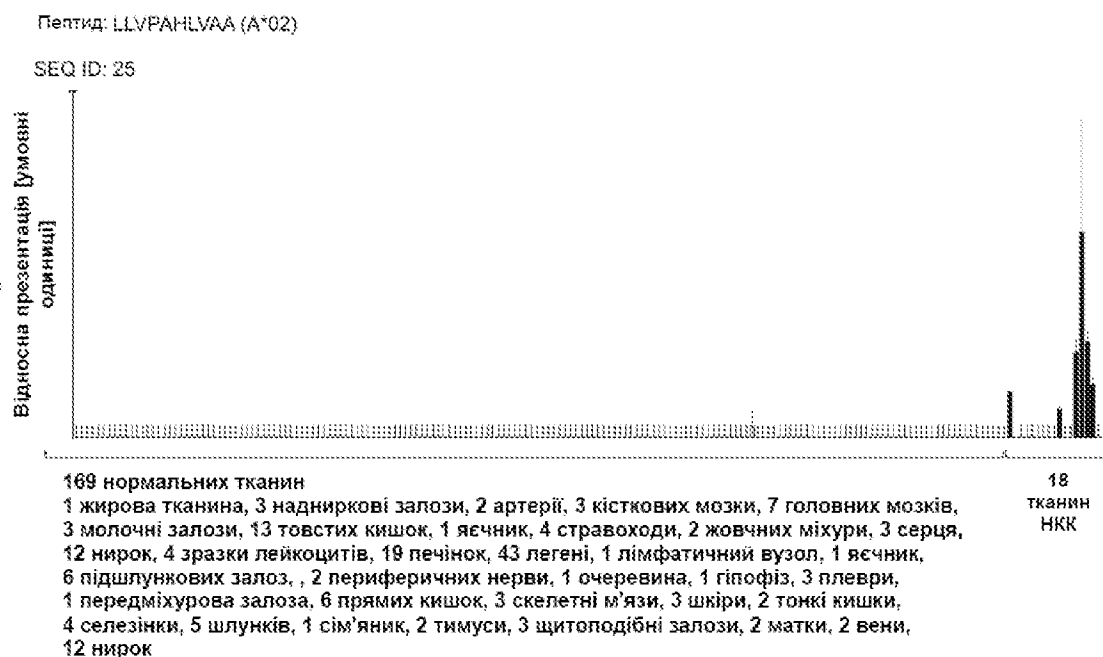
Пептид: VVDEGPTGV (A*02)



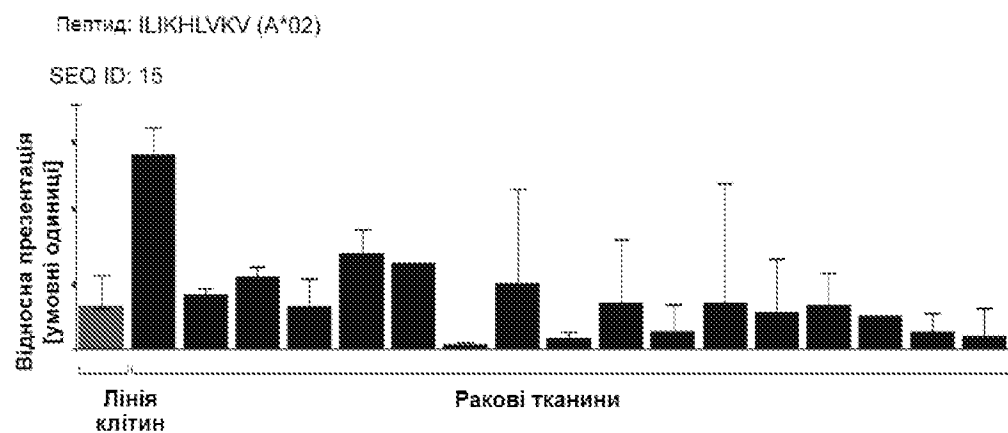
Пептид, виявлений на:

1 клітинній лінії лейкоцитів, 5 нормальних тканинах (3 легені, 1 лімфатичний вузол, 1 селезінка), 77 ракових тканинах (2 раки головного мозку, 1 рак молочної залози, 1 рак товстої кишки, 1 рак стравоходу, 10 раків нирки, 1 лейкоз, 1 рак печінки, 35 раків легенів, 12 раків яєчника, 8 раків підшлункової залози, 5 раків шлунка) (зліва направо)

Фігура 1E



Фігура 1F



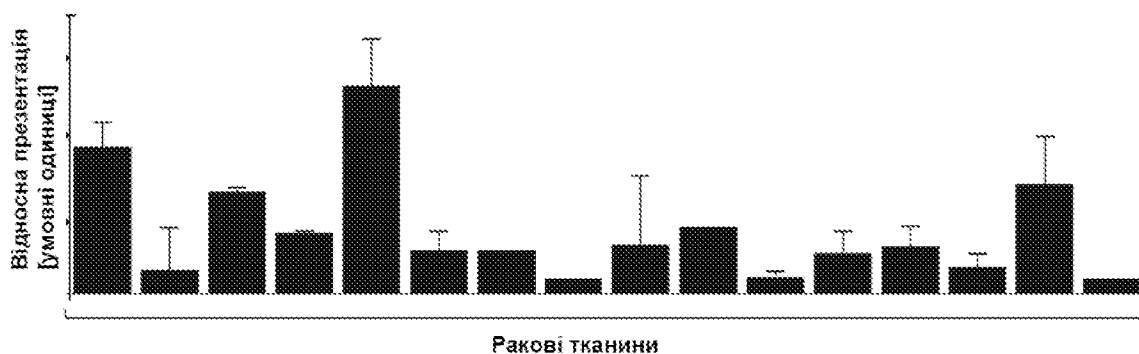
Пептид, виявлений на:

1 клітинній лінії (меланома), 17 ракових тканинах (1 рак товстої кишки, 5 раків нирки, 1 рак печінки, 3 раки легенів, 4 раки лімфатичних вузлів, 1 рак яєчка, 2 раки матки) (зліва направо)

Фігура 1G

Пептид: FIADVVEKI (A*02)

SEQ ID: 33



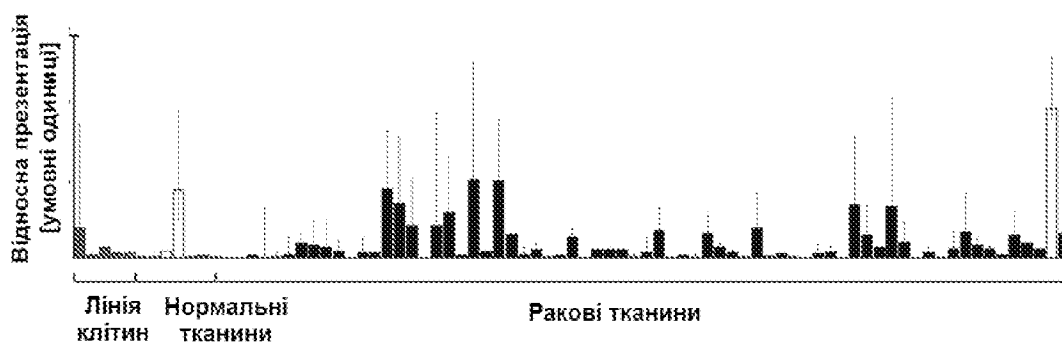
Пептид, виявлений на:

16 ракових тканинах (1 рак головного мозку, 1 рак молочної залози, 1 рак стравоходу, 3 раки нирки, 1 рак лейкоцитів, 5 раків легенів, 1 рак лімфатичних вузлів, 2 раки яєчника, 1 рак підшлункової залози) (зліва направо)

Фігура 1H

Пептид: VLLDTILQL (A*02)

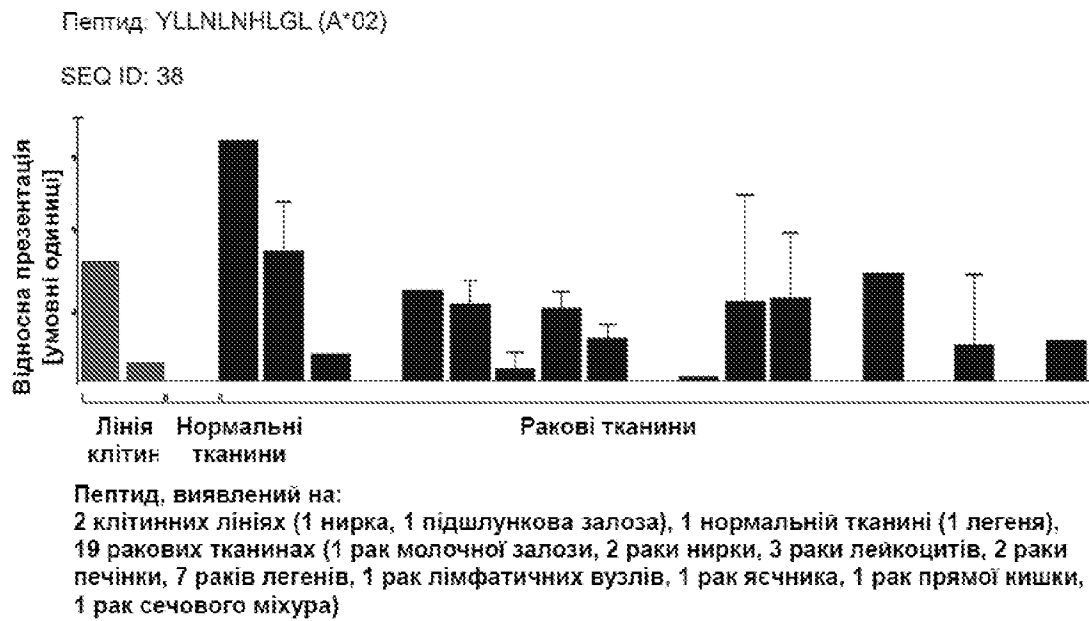
SEQ ID: 38



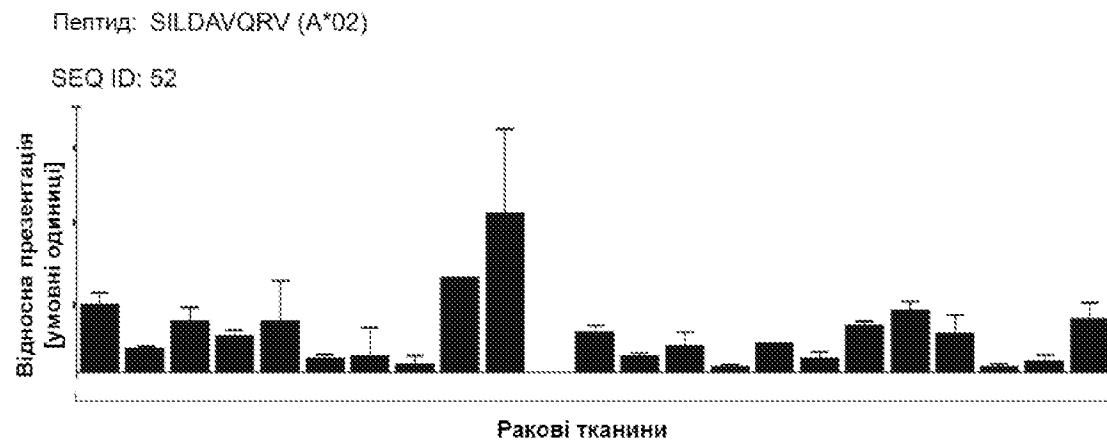
Пептид, виявлений на:

1 доброякісній пухлині (нирки), 3 клітинних лініях (1 підшлункова залоза, 1 плевра, 1 передміхурова залоза), 1 іншому захворюванні, 9 нормальних тканинах (1 легень, 1 лімфатичний вузол, 2 плаценти, 1 тонка кишка, 3 селезінки, 1 щитоподібна залоза), 67 ракових тканинах (1 рак жовчних протоків, 5 раків головного мозку, 2 раки молочної залози, 2 раки стравоходу, 2 раки жовчного міхура, 4 раки нирки, 7 раків лейкоцитів, 3 раки печінки, 16 раків легенів, 5 раків лімфатичних вузлів, 1 рак мієлоїдних клітин, 9 раків яєчника, 1 рак підшлункової залози, 1 рак прямої кишки, 5 раків шкіри, 2 раки сечового міхура, 1 рак матки) (зліва направо)

Фігура 1I



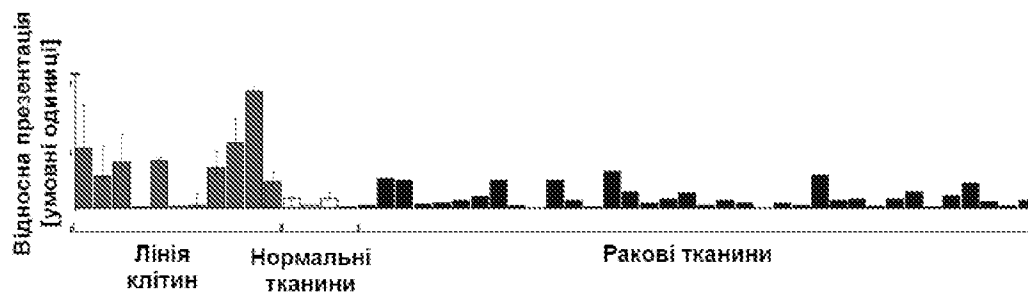
Фігура 1J



Фігура 1K

Пептид: SLLQATDFMSL (A*02)

SEQ ID: 82



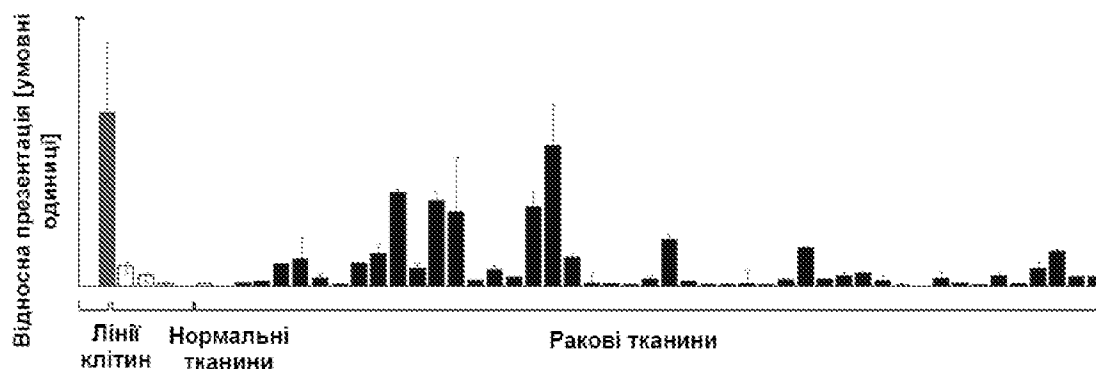
Пептид, виявлений на:

11 клітинних лініях (11 ліній клітин підшлункової залози), 4 нормальних тканинах (1 нирка, 1 лімфатичний вузол, 1 плацента, 1 трахея), 36 ракових тканинах (1 рак жовчних протоків, 5 раків головного мозку, 3 раки молочної залози, 4 раки товстої кишки, 1 рак стравоходу, 3 раки нирки, 1 рак печінки, 9 раків легенів, 1 рак лімфатичних вузлів, 1 рак яєчника, 2 раки підшлункової залози, 1 рак прямої кишки, 2 раки шкіри, 1 рак сечового міхура, 1 рак матки)

Фігура 1L

Пептид: KIPPVSPSI (A*02)

SEQ ID: 98



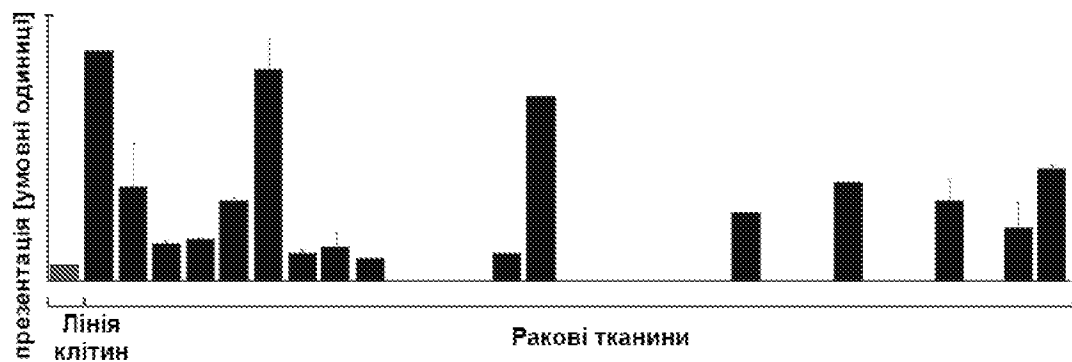
Пептид, виявлений на:

2 клітинних лініях (2 нирки), 4 нормальних тканинах (1 надниркова залоза, 1 легень, 1 лімфатичний вузол, 1 плацента), 47 ракових тканинах (4 раки головного мозку, 1 рак молочної залози, 1 рак стравоходу, 1 рак жовчного міхура, 5 раків нирки, 1 рак лейкоцитів, 5 раків печінки, 12 раків легенів, 2 раки лімфатичних вузлів, 4 раки яєчника, 3 раки передміхурової залози, 2 раки шкіри, 6 раків матки) (зліва направо)

Фігура 1M

Пептид: KLQDGLLHI (A*02)

SEQ ID: 103



Пептид, виявлений на:

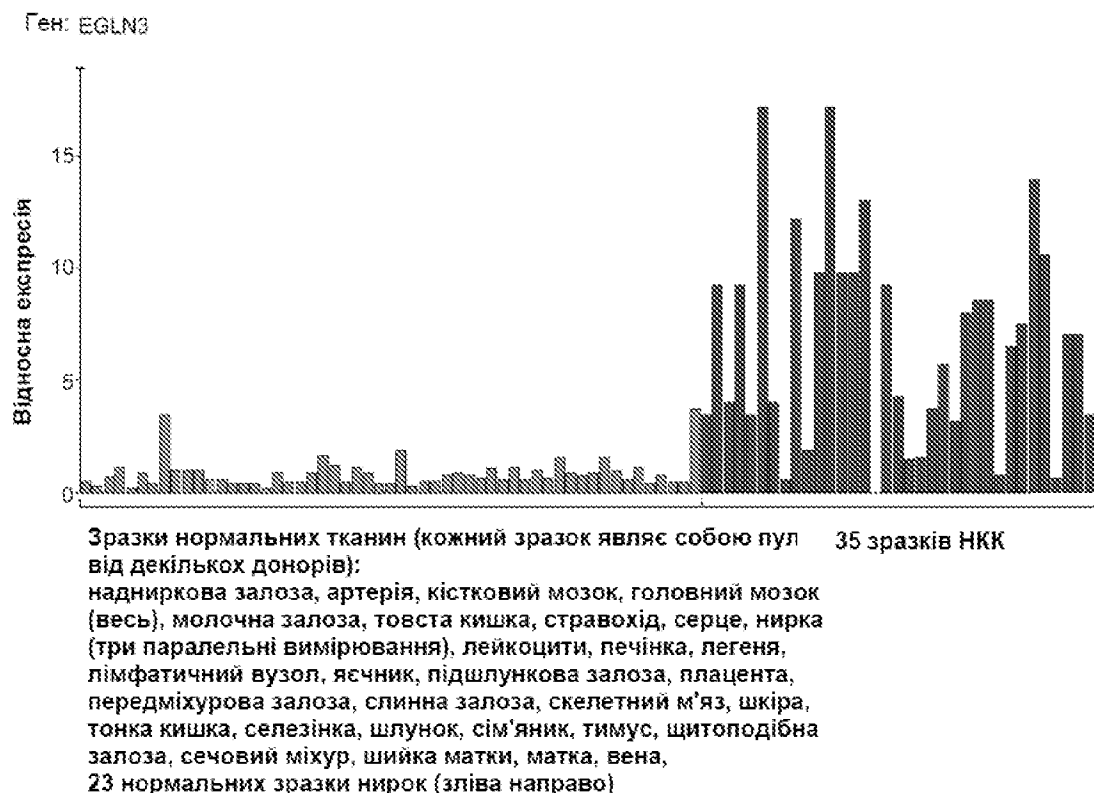
1 клітинній лінії (1 лінія клітин крові), 29 ракових тканинах (2 раки головного мозку, 5 раків товстої кишки, 3 раки нирки, 1 рак печінки, 4 раки легенів, 2 раки лімфатичних вузлів, 3 раки яєчника, 1 рак підшлункової залози, 1 рак прямої кишки, 6 раків шкіри, 1 рак яєчка) (зліва направо)

Фігура 1N

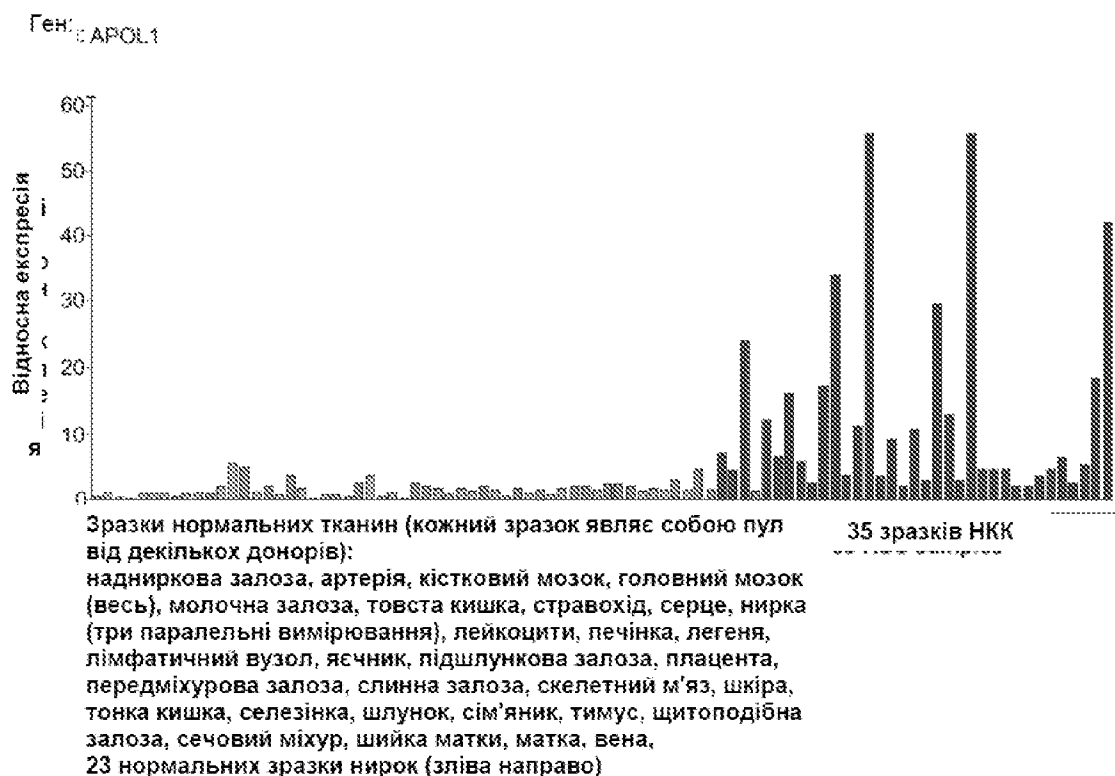
Ген: GAL3ST1



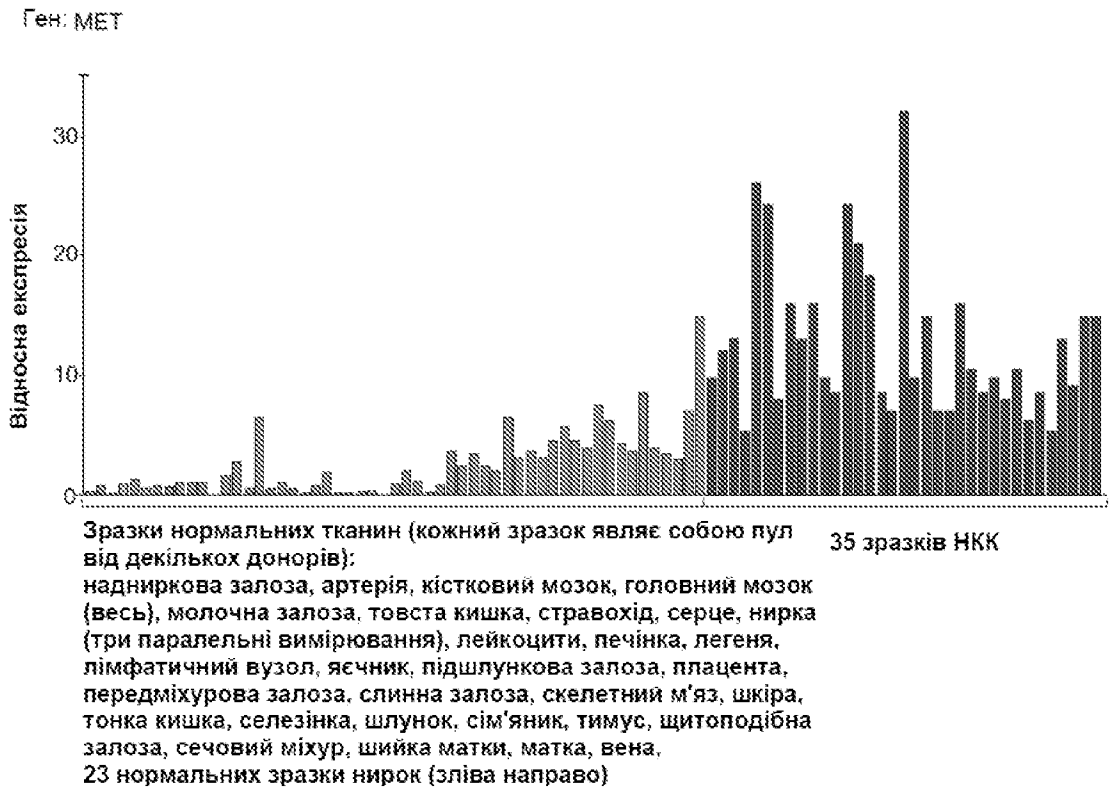
Фігура 2A



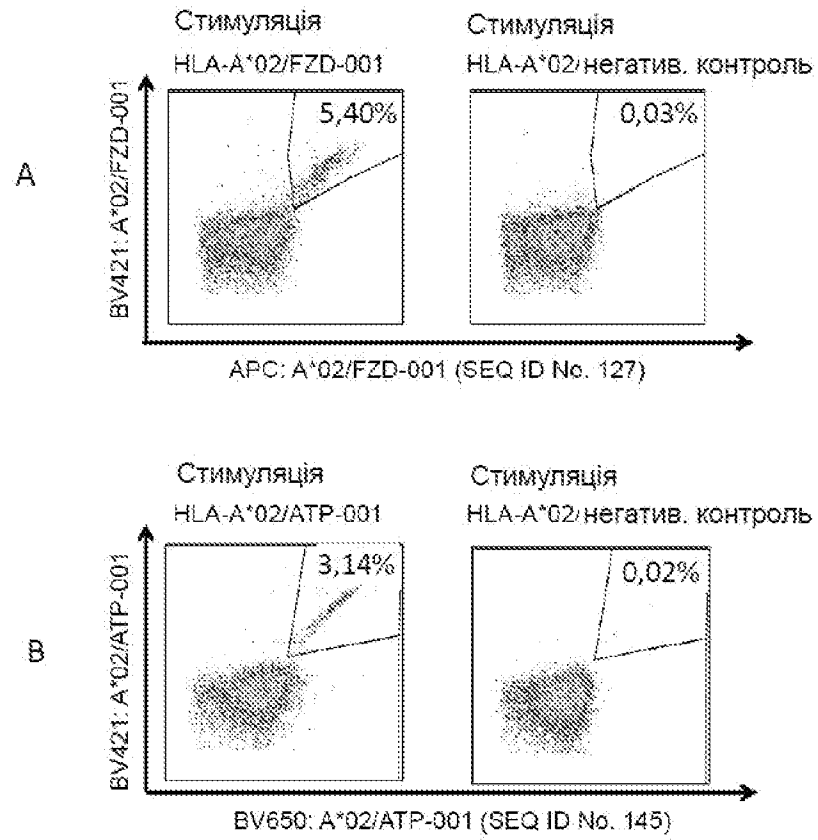
Фігура 28



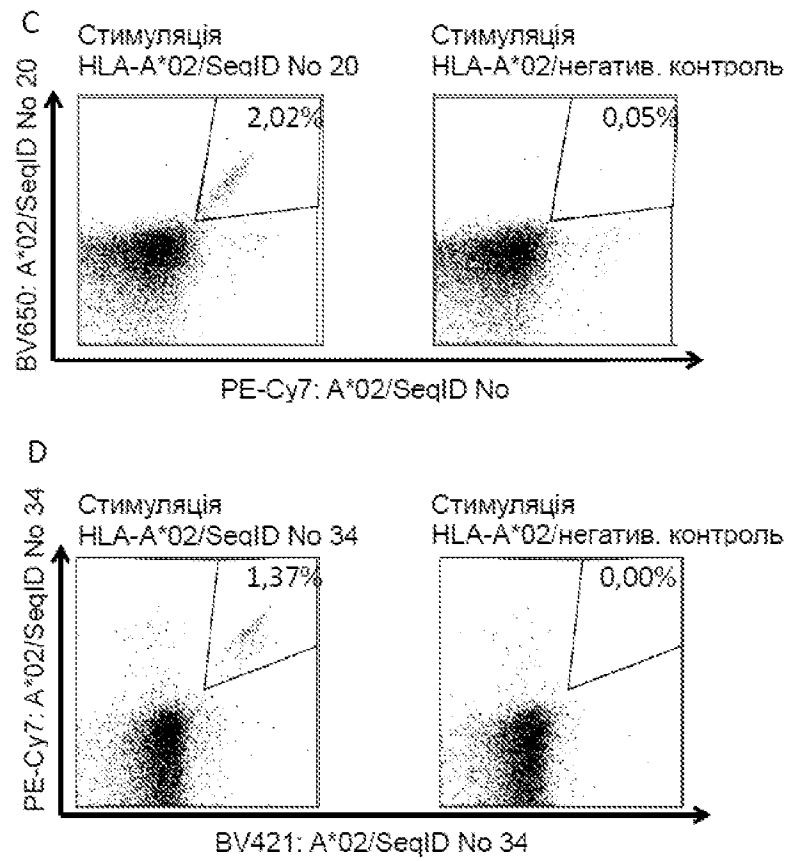
Фігура 29



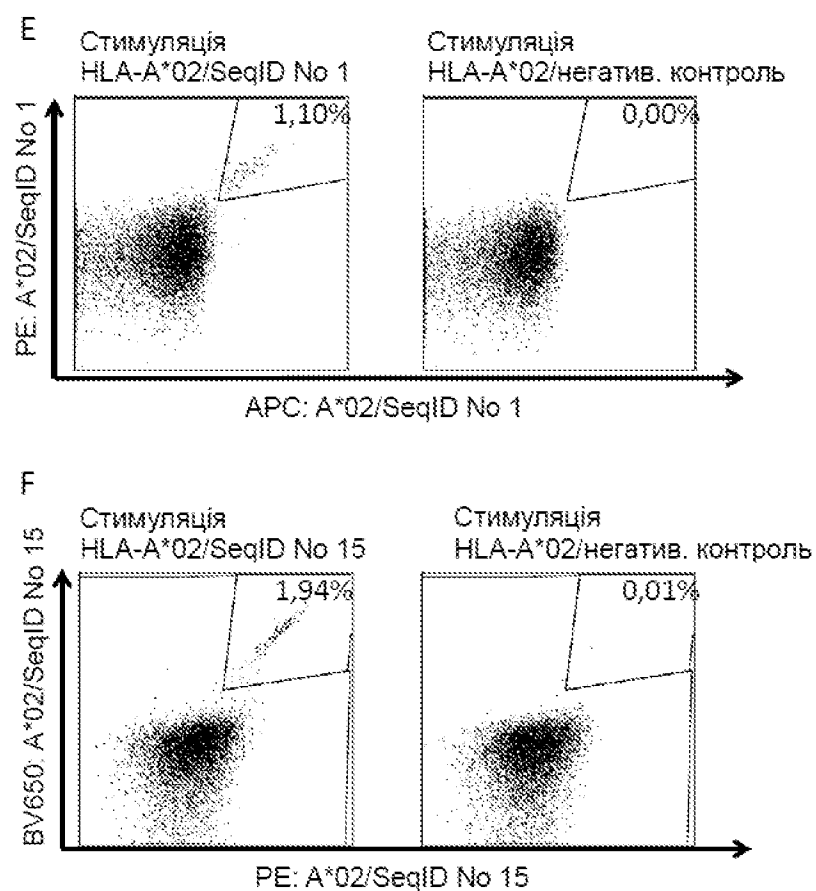
Фігура 2D



Фігура 3



Фігура 3 (продовж.)



Фігура 3 (продовж.)