



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

A61K 38/08 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 17/02 (2006.01)

C12N 5/0781 (2010.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 39/0011 (2018.08); C07K 7/06 (2018.08); A61K 2039/5154 (2018.08); A61K 2039/5158 (2018.08)

(21)(22) Заявка: 2015143164, 11.03.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
11.03.2014Дата регистрации:
30.10.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
12.03.2013 US 61/777,334

(43) Дата публикации заявки: 13.04.2017 Бюл. № 11

(45) Опубликовано: 30.10.2018 Бюл. № 31

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 12.10.2015

(86) Заявка РСТ:
JP 2014/001350 (11.03.2014)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2014/141683 (18.09.2014)Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ЦУНОДА Такуя (JP),
ОСАВА Рюдзи (JP),
ЙОСИМУРА Сатико (JP),
ВАТАНАБЕ Томохиса (JP)

(73) Патентообладатель(и):

ОНКОТЕРАПИ САЙЕНС, ИНК. (JP)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 2010/040641 A1, 18.02.2010. WO 2008/102557 A1, 28.08.2008. US 2009/233279 A1, 17.09.2009. MARSH S.G.E. et al., "The HLA FactsBook", Academic Press, 1st ed., 2000. СОБОЛЕВ Б.Н. и др. "Компьютерное конструирование вакцин." Биомедицинская химия, 2003, 49(4): 309-332.

(54) ПЕПТИДЫ KNTC2 И СОДЕРЖАЩИЕ ИХ ВАКЦИНЫ

(57) Реферат:

Данное изобретение относится к иммунологии. Предложен выделенный пептид-эпитоп, полученный из ассоциированной с кинетохором молекулы 2 (KNTC2) и обладающий способностью к индукции цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) в присутствии антигенпрезентирующей клетки (APC), несущей HLA-A*0201. Также описан кодирующий его полинуклеотид, вектор, клетка-хозяин для

получения указанного пептида. Кроме того, рассмотрены способы индукции APC и CTL, композиция для индукции CTL, выделенная APC в комплексе с пептидом, фармацевтическая композиция для лечения и/или профилактики злокачественной опухоли, экспрессирующей KNTC2 и HLA-A*0201, и/или профилактики ее послеоперационного рецидива; способ индукции иммунного ответа против злокачественной

опухоли. Раскрыт способ скрининга на пептид со способностью индукции CTL. Настоящее изобретение может найти дальнейшее применение

в иммунотерапии опухолей, ассоциированных с KNTC2. 11 н. и 2 з.п. ф-лы, 4 ил., 1 табл.

R U 2 6 7 1 3 9 5 C 2

R U 2 6 7 1 3 9 5 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61K 38/08 (2006.01)*A61P 35/00* (2006.01)*A61K 39/385* (2006.01)*C07K 7/06* (2006.01)*C07K 17/02* (2006.01)*C12N 5/0781* (2010.01)*C12N 5/0783* (2010.01)*C12N 15/63* (2006.01)*C12N 5/10* (2006.01)*G01N 33/53* (2006.01)*C07K 16/18* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 39/0011 (2018.08); *C07K 7/06* (2018.08); *A61K 2039/5154* (2018.08); *A61K 2039/5158* (2018.08)(21)(22) Application: **2015143164**, 11.03.2014(24) Effective date for property rights:
11.03.2014Registration date:
30.10.2018

Priority:

(30) Convention priority:
12.03.2013 US 61/777,334(43) Application published: **13.04.2017** Bull. № 11(45) Date of publication: **30.10.2018** Bull. № 31(85) Commencement of national phase: **12.10.2015**(86) PCT application:
JP 2014/001350 (11.03.2014)(87) PCT publication:
WO 2014/141683 (18.09.2014)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**TSUNODA Takuya (JP),
OSAVA Ryudzi (JP),
JOSIMURA Satiko (JP),
VATANABE Tomokhisa (JP)**

(73) Proprietor(s):

ONKOTERAPI SAJENS, INK. (JP)**(54) KNTC2 PEPTIDES AND VACCINES CONTAINING THE SAME**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: this invention relates to immunology. Isolated peptide-epitope derived from the kinetochore-associated molecule 2 (KNTC2) is proposed and able to induce cytotoxic T-lymphocytes (CTL) in the presence of an antigen-presenting cell (APC) bearing HLA-A*0201. A polynucleotide encoding it, a vector, a host cell for producing said peptide is also described. In addition, methods for inducing APC and CTL, a composition for inducing CTL isolated by APC in combination with a peptide, a

pharmaceutical composition for the treatment and/or prevention of a malignant tumor expressing KNTC2 and HLA-A*0201, and/or preventing its postoperative relapse; a method for inducing an immune response against a malignant tumor. A screening method for a peptide with the CTL induction property is disclosed.

EFFECT: present invention may find further application in immunotherapy of tumors associated with KNTC2.

13 cl, 4 dwg, 1 tbl

Область техники

[0001] Настоящее изобретение относится к области биологической науки, более конкретно, к области терапии злокачественных опухолей. В частности, настоящее изобретение относится к новым пептидам, которые являются эффективными в качестве

5 противораковых вакцин, а также к лекарственным средствам для лечения и/или профилактики опухолей.

[0002] Приоритет

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США № 61/777334, зарегистрированной 12 марта 2013 года, полное содержание которой

10 включено в настоящий документ в качестве ссылки.

Предшествующий уровень техники

[0003] Показано, что CD8-положительные цитотоксические Т-лимфоциты (CTL) распознают пептиды-эпитопы, получаемые из опухолеассоциированных антигенов (ТАА) на молекуле главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I, а затем

15 вызывают цитолиз этих опухолевых клеток. Со времени открытия семейства антигенов меланомы (MAGE) в качестве первого примера ТАА, обнаружены многие другие ТАА, преимущественно посредством иммунологических подходов (NPL 1-2). В настоящее время некоторые из ТАА находятся в клинической разработке в качестве иммунотерапевтических мишеней.

[0004] Для пролиферации и выживания злокачественных клеток необходимыми являются подходящие ТАА. Использование таких ТАА в качестве мишеней для

20 иммунотерапии может минимизировать хорошо описанный риск ускользания злокачественных клеток от иммунологического надзора, приписываемый делеции, мутации и/или снижению экспрессии ТАА, такой как следствие направляемой

25 терапевтическими средствами иммунной селекции. Таким образом, необходимо дальнейшее разработка идентификации новых ТАА, способных индуцировать сильный и специфический противоопухолевый иммунный ответ. Таким образом, клиническое применение стратегий пептидной вакцинации для различных типов злокачественных опухолей продолжается (NPL 3-10). В настоящее время существует несколько публикаций

30 о клинических испытаниях с использованием этих получаемых из ТАА пептидов. К сожалению, в этих испытаниях вакцин для злокачественных опухолей получили только низкую частоту объективных ответов (NPL 11-13). Таким образом, остается необходимость в новых ТАА в качестве иммунотерапевтических мишеней.

[0005] KNTC2, также известная как "ассоциированная с кинетохором молекула 2",

35 HEC1 или NDC 80, представляет собой участника комплекса Ndc80, который состоит из двух подкомплексов Ndc80 (KNTC2)-Nuf2 (CDCA1) и Spc24-Spc25 (NPL 14). Участки прикрепления комплекса CDCA1-KNTC2 на внешней пластинке кинетохора порождают зависимые от микротрубочек силы для движения хромосомы и регулируют контрольную точку сборки белков веретена деления на кинетохоре (NPL 15).

[0006] В ходе выяснения молекулярных механизмов при немелкоклеточном раке легких (NSCLC) посредством анализа профиля полногеномной экспрессии с

40 использованием микропанели кДНК, содержащей 27648 генов, выявлено, что KNTC2 часто сверхэкспрессирована при NSCLC (NPL 16, 17, 18, 19, 20). Анализы посредством "нозерн"-блоттинга выявили, что транскрипт этого гена высоко экспрессирован в

45 тканях рака легких, но не экспрессирован в нормальных тканях, за исключением семенников. Кроме того, показано, что последующий нокдаун экспрессии KNTC2 посредством миРНК значительно подавляет рост клеток NSCLC (NPL 21, PTL 1).

[0007] Также сообщалось, что экспрессия KNTC2 повышена в тканях таких

злокачественных опухолей, как рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, холангиокарцинома, хронический миелолейкоз (СМЛ), колоректальный рак, рак пищевода, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), лимфома, остеосаркома, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечно-клеточный

5 рак, мелкоклеточный рак легких (SCLC) и опухоль мягких тканей (PTL 2).
 [0008] Кроме того, авторы настоящего изобретения идентифицировали пептид KNTC2, который может связываться с HLA-A24 и индуцировать CTL, и который пригоден для иммунотерапии, направленной на позитивных по HLA-A24 пациентов (PTL 2). Однако хотя эти пептиды могут подходить для пациентов, экспрессирующий подтип HLA-A24,
 10 остается необходимость в пептидах, которые индуцируют CTL у пациентов, экспрессирующих другие типы антигена HLA.

Список цитируемых документов

Патентная литература

[0009] [PTL 1] WO2 007/013480.

15 [PTL 2] WO 2008/102557.

Непатентная литература

[0010] [NPL 1] Boon T, Int. J. Cancer 1993, 54(2): 177-80.

[NPL 2] Boon T & van der Bruggen P, J. Exp. Med. 1996, 183(3): 725-9.

[NPL 3] Harris CC, J. Natl. Cancer Inst. 1996, 88(20): 1442-55.

20 [NPL 4] Butterfield LH et al., Cancer Res. 1999, 59(13): 3134-42.

[NPL 5] Vissers JL et al., Cancer Res. 1999, 59(21): 5554-9.

[NPL 6] van der Burg SH et al., J. Immunol. 1996, 156(9): 3308-14.

[NPL 7] Tanaka F et al., Cancer Res. 1997, 57(20): 4465-8.

[NPL 8] Fujie T et al., Int. J. Cancer 1999, 80(2): 169-72.

25 [NPL 9] Kikuchi M et al., Int. J. Cancer 1999, 81(3): 459-66.

[NPL 10] Oiso M et al., Int. J. Cancer 1999, 81(3): 387-94.

[NPL 11] Belli F et al., J. Clin. Oncol. 2002, 20(20): 4169-80.

[NPL 12] Coulie PG et al., Immunol. Rev. 2002, 188: 33-42.

[NPL 13] Rosenberg SA et al., Nat. Med. 2004, 10(9): 909-15.

30 [NPL 14] Ciferri C, et al. J. Biol. Chem. 2005; 280: 29088-95.

[NPL 15] Wigge PA, et al. J. Cell Biol. 2001; 152: 349-60.

[NPL 16] Kikuchi T, et al., Oncogene. 2003; 22:2192-205.

[NPL 17] Suzuki C, et al., Cancer Res. 2003; 63:7038-41.

[NPL 18] Kakiuchi S, et al., Mol. Cancer Res. 2003; 1:485-99.

35 [NPL 19] Zembutsu H, et al., Int. J. Oncol. 2003; 23:29-39.

[NPL 20] Kakiuchi S, et al., Hum. Mol. Genet. 2004; 13:3029-43.

[NPL 21] Hayama S, et al. Cancer Res. 2006 Nov 1;66(21):10339-48.

Сущность изобретения

[0011] Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на открытии
 40 новых пептидов, которые могут служить в качестве подходящих мишеней для иммунотерапии. Поскольку ТАА, как правило, воспринимаются иммунной системой как "свое" и, таким образом, часто не имеют врожденной иммуногенности, обнаружение подходящих мишеней все еще является важным. При осуществлении настоящего изобретения продемонстрировано, что KNTC2 (типичная последовательность
 45 аминокислот приведена в SEQ ID NO: 79; типичная последовательность нуклеотидов приведена в SEQ ID NO: 77 (номер доступа GeneBank NM_006101) или SEQ ID NO 78 (номер доступа GeneBank AF017790)) специфически сверхэкспрессирована в злокачественных опухолях, примеры которых в качестве неограничивающих примеров

включают, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, холангиокарциному, хронический миелолейкоз (CML), колоректальный рак, рак пищевода, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), лимфому, остеосаркому, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечно-клеточный рак, мелкоклеточный рак легких (SCLC) и опухоль мягких тканей. Таким образом, настоящее изобретение сосредоточено на KNTC2 в качестве кандидата на мишень для иммунотерапии злокачественных опухолей/опухолей.

[0012] В связи с этим настоящее изобретение, по меньшей мере частично, относится к идентификации среди пептидов, полученных из KNTC2, специфических пептидо-эпитопов, способных индуцировать цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), специфичные к KNTC2.

[0013] Результаты, описываемые в настоящем документе, демонстрируют, что идентифицированные пептиды являются рестриктированными по HLA-A2 пептидами-эпитопами, которые могут индуцировать сильный и специфический иммунный ответ против экспрессирующих KNTC2 клеток.

[0014] Таким образом, задачей настоящего изобретения является предоставление получаемых из KNTC2 пептидов, которые можно использовать для индукции CTL *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo* рестриктированным по HLA-A2 способом или вводить индивидууму для индукции иммунного ответа против злокачественных опухолей, примеры которых включают, но не ограничиваются ими, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, холангиокарциному, хронический миелолейкоз (CML), колоректальный рак, рак пищевода, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), лимфому, остеосаркому, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечно-клеточный рак, мелкоклеточный рак легких (SCLC) и опухоль мягких тканей.

[0015] Как правило, длина пептидов по настоящему изобретению составляет менее 15, 14, 13, 12, 11 или 10 аминокислот. Предпочтительными пептидами являются нонапептиды и декапептиды. Особенно предпочтительные нонапептиды и декапептиды имеют последовательность аминокислот, выбранную из SEQ ID NO: 2, 3, 7, 17, 41, 53 и 68.

[0016] Настоящее изобретение также включает модифицированные пептиды с последовательностями аминокислот, в которых в последовательностях аминокислот, выбранных из SEQ ID NO: 2, 3, 7, 17, 41, 53 и 68 заменены, удалены, вставлены и/или добавлены одна, две или более аминокислот, при условии, что получаемые модифицированные пептиды сохраняют необходимую способность к индукции CTL исходного немодифицированного пептида.

[0017] В одном из вариантов осуществления, когда исходный пептид представляет собой 9-мер (например, один из SEQ ID NO: 2, 3, 7 и 17), размер модифицированного пептида предпочтительно находится в диапазоне от 9 до 40 аминокислот, например, в диапазоне от 9 до 20 аминокислот, например, в диапазоне от 9 до 15 аминокислот. Подобным образом, когда исходный пептид представляет собой 10-мер (например, один из SEQ ID NO: 41, 53 и 68), размер модифицированного пептида предпочтительно находится в диапазоне от 10 до 40 аминокислот, например, в диапазоне от 10 до 20 аминокислот, например, в диапазоне от 10 до 15 аминокислот.

[0018] Настоящее изобретение дополнительно включает выделенные полинуклеотиды, кодирующие любой из пептидов по настоящему изобретению. Эти полинуклеотиды можно использовать для индукции или получения антигенпрезентирующих клеток (APC), обладающих способностью к индукции CTL. Также как пептиды по настоящему

изобретению, такие APC можно вводить индивидууму для индукции иммунного ответа против злокачественной опухоли.

[0019] При введении индивидууму пептиды по настоящему изобретению могут презентироваться на поверхности APC таким образом, чтобы индуцировать нацеливание CTL на соответствующие пептиды. Таким образом, одной из задач настоящего изобретения является предоставление средств или композиций, включающих один или более пептидов по настоящему изобретению или один или несколько полинуклеотидов, кодирующих такие пептиды. Композицию по настоящему изобретению можно использовать для индукции CTL, и, таким образом, она находит применение для лечения и/или профилактики злокачественной опухоли и/или предотвращения метастазирования или послеоперационного рецидива рака. Примеры заданных злокачественных опухолей, предусматриваемых в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются ими, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, холангиокарциному, хронический миелолейкоз (CML), колоректальный рак, рак пищевода, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), лимфому, остеосаркому, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечно-клеточный рак, мелкоклеточный рак легких (SCLC) и опухоль мягких тканей.

[0020] По настоящему изобретению дополнительно предусмотрены фармацевтические композиции, которые содержат один или более пептидов или полинуклеотидов по настоящему изобретению. Фармацевтическую композицию предпочтительно формулируют для применения в лечении и/или профилактике злокачественной опухоли, более конкретно, первичной злокачественной опухоли, и/или предотвращения ее метастазирования или послеоперационного рецидива. Наряду или в дополнение к пептидам или полинуклеотидам по настоящему изобретению фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать в качестве активных ингредиентов APC или экзосомы, которые презентируют любой из пептидов по настоящему изобретению.

[0021] Пептиды или полинуклеотиды по настоящему изобретению можно использовать для индукции APC, которые презентируют на поверхности комплекс лейкоцитарного антигена человека (HLA) и пептида по настоящему изобретению, например, приведением APC, получаемых у индивидуума, в контакт с пептидом по настоящему изобретению или введением полинуклеотида, кодирующего пептид по настоящему изобретению, в APC. Такие APC имеют способность к индукции CTL, которые специфически распознают клетки, которые презентируют на поверхности пептиды-мишени, таким образом, и являются пригодными в рамках иммунотерапии злокачественных опухолей. Таким образом, настоящее изобретение относится к способам индукции APC со способностью к индукции CTL, а также APC, полученным такими способами.

[0022] Кроме того, настоящее изобретение также относится к композициям, которые индуцируют APC со способностью индуцировать CTL, где такие композиции включают любые пептиды или полинуклеотиды по настоящему изобретению.

[0023] Дополнительной задачей настоящего изобретения является обеспечение способов индукции CTL, где такие способы предусматривают стадию совместного культивирования CD8-положительных Т-клеток с APC, которые презентируют на своей поверхности комплекс HLA-антигена и пептида по настоящему изобретению, стадию совместного культивирования CD8-положительных Т-клеток с экзосомами, презентирующими на их поверхности комплекс HLA-антигена и пептида по настоящему изобретению, или стадию введения полинуклеотида, кодирующего субъединицы Т-

клеточного рецептора (TCR), или полинуклеотидов, кодирующих каждую из субъединиц TCR, где TCR может связываться с комплексом пептида по настоящему изобретению и антигена HLA, презентируемым на клеточной поверхности. CTL, получаемые такими способами, могут находить применение при лечении и/или профилактике злокачественных опухолей, примеры которых могут включать рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, холангиокарциному, хронический миелолейкоз (CML), колоректальный рак, рак пищевода, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), лимфому, остеосаркому, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечно-клеточный рак, мелкоклеточный рак легких (SCLC) и опухоль мягких тканей, но не ограничиваться ими. Таким образом, настоящее изобретение относится к способам индукции CTL и к CTL, получаемым такими способами.

[0024] Еще одной задачей настоящего изобретения является предоставление выделенных APC, которые презентируют на поверхности комплекс HLA-антигена и пептида по настоящему изобретению. Кроме того, настоящее изобретение относится к выделенным CTL, которые направлены на пептиды по настоящему изобретению. Такие APC и CTL можно использовать для иммунотерапии злокачественных опухолей. Такие CTL также можно определить как CTL, которые могут распознавать (или связываться) комплекс пептида по настоящему изобретению и антигена HLA на клеточной поверхности. Эти APC и CTL находят применение в рамках иммунотерапии злокачественной опухоли.

[0025] Еще одной задачей настоящего изобретения является предоставление способов индукции иммунного ответа против злокачественной опухоли у нуждающегося в этом индивидуума, где такие способы включают стадию введения индивидууму композиции, содержащей по меньшей мере один компонент, выбранный из (а) пептида по настоящему изобретению или полинуклеотида, кодирующего его, (b) APC или экзосомы, презентирующей такой пептид(ы) и (с) CTL, который может распознавать клетку, презентирующую на своей поверхности пептид по настоящему изобретению.

[0026] Один из аспектов настоящего изобретения относится к пептиду по настоящему изобретению, средству или композиции, содержащим такой пептид для применения в качестве лекарственного средства.

[0027] Применимость настоящего изобретения распространяется на любое из ряда заболеваний, связанных со сверхэкспрессией KNTC2 или возникающих в результате сверхэкспрессии KNTC2, такое как злокачественная опухоль, примеры которой включают рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, холангиокарциному, хронический миелолейкоз (CML), колоректальный рак, рак пищевода, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), лимфому, остеосаркому, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечно-клеточный рак, мелкоклеточный рак легких (SCLC) и опухоль мягких тканей, но не ограничиваются ими.

[0028] Более конкретно, настоящее изобретение относится к следующему:

[1] Выделенный пептид со способностью к индукции цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), где пептид содержит последовательность аминокислот (а) или (b) ниже:

(а) последовательность аминокислот иммунологически активного фрагмента KNTC2;

(b) последовательность аминокислот, в которой в последовательности аминокислот иммунологически активного фрагмента KNTC2 заменены, введены, удалены и/или добавлены 1, 2 или несколько аминокислот,

где CTL, индуцируемые пептидом, обладают специфической цитотоксической активностью против клеток, которые презентируют фрагмент, получаемый из KNTC2;

[2] Пептид по [1], где пептид содержит последовательность аминокислот (а) или (б) ниже:

(а) последовательность аминокислот, выбранная из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3, 7, 17, 41, 53 и 68;

5 (б) последовательность аминокислот, в которой в последовательности аминокислот, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3, 7, 17, 41, 53 и 68, заменены, введены, удалены и/или добавлены 1, 2 или несколько аминокислот;

[3] Пептид по [2], где пептид обладает одной или обеими из следующих характеристик:

(а) вторая аминокислота от N-конца представляет собой лейцин или метионин; и

10 (б) С-концевая аминокислота представляет собой валин или лейцин;

[4] Пептид по любому из [1]-[3], где пептид представляет собой нонапептид или декапептид;

[5] Пептид по [4], где пептид состоит из последовательности аминокислот, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3, 7, 17, 41, 53 и 68.

15 [6] Выделенный полинуклеотид, кодирующий пептид по любому из [1]-[5];

[7] Композиция для индукции CTL, где композиция содержит по меньшей мере один активный ингредиент, выбранный из группы, состоящей из:

(а) пептида по любому из [1]-[5];

(б) полинуклеотида по [6];

20 (с) антигенпрезентирующей клетки (APC), которая презентует на своей поверхности пептид по любому из [1]-[5]; и

(d) экзосомы, которая презентует на своей поверхности пептид по любому из [1]-[5];

[8] Фармацевтическая композиция для лечения и/или профилактики злокачественной опухоли и/или профилактики ее послеоперационного рецидива, где композиция содержит по меньшей мере один активный ингредиент, выбранный из группы, состоящей из:

(а) пептида по любому из [1]-[5];

(б) полинуклеотида по [6];

(с) APC, которая презентует на своей поверхности пептид по любому из [1]-[5];

30 (d) экзосомы, которая презентует на своей поверхности пептид по любому из [1]-[5]; и

(е) CTL, который может распознавать клетку, презентующую пептид по любому из [1]-[5];

[9] Фармацевтическая композиция по [8], где фармацевтическую композицию формулируют для введения индивидууму, антиген HLA которого представляет собой HLA-A2;

[10] Способ индукции APC со способностью к индукции CTL, где способ включает стадию, выбранную из группы, состоящей из:

(а) приведения APC в контакт с пептидом по любому из [1]-[5], и

40 (б) введения полинуклеотида, кодирующего пептид по любому из [1]-[5], в APC;

[11] Способ индукции CTL, где способ включает стадию, выбранную из группы, состоящей из:

(а) совместного культивирования CD8-положительной Т-клетки с APC, которая презентует на своей поверхности комплекс антигена HLA и пептида по любому из [1]-[5];

45 (б) совместного культивирования CD8-положительной Т-клетки с экзосомой, которая презентует на своей поверхности комплекс антигена HLA и пептида по любому из [1]-[5]; и

(с) введения в CD8-положительную Т-клетку полинуклеотида, кодирующего обе субъединицы Т-клеточного рецептора (TCR), или полинуклеотидов, кодирующих каждую из субъединиц TCR, где TCR, сформированный указанными субъединицами, способен связываться с комплексом пептида по любому из [1]-[5] и антигена HLA на клеточной

поверхности;

[12] Выделенная APC, которая презентует на своей поверхности комплекс антигена HLA и пептида по любому из [1]-[5];

[13] APC по [12], которую индуцируют способом по [10];

[14] Выделенный CTL, который нацелен на пептид по любому из [1]-[5];

[15] CTL по [14], который индуцируют способом по [11];

[16] Способ индукции иммунного ответа против злокачественной опухоли у индивидуума, где способ включает стадию введения индивидууму композиции, содержащей пептид по любому из [1]-[5], или полинуклеотид, кодирующий этот пептид;

[17] Антитело или его иммунологически активный фрагмент против пептида по любому из [1]-[5];

[18] Вектор, содержащий последовательность нуклеотидов, кодирующую пептид по любому из [1]-[5];

[19] Клетка-хозяин, трансформированная или трансфицированная вектором по [18];

[20] Диагностический набор, содержащий пептид по любому из [1]-[5], полинуклеотид по [6] или антитело или иммунологически активный фрагмент по [17]; и

[21] Способ скрининга пептида, обладающего способностью к индукции CTL, которые обладают специфической цитотоксической активностью против клеток, которые презентуют фрагмент, получаемый из KNTC2, где способ включает стадии:

(i) предоставления последовательности-кандидата, состоящей из последовательности аминокислот, модифицированной заменой, удалением, встраиванием и/или добавлением одного, двух или нескольких аминокислотных остатков в исходной последовательности аминокислот, где исходная последовательность аминокислот выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3, 7, 17, 41, 53 и 68;

(ii) отбора последовательности-кандидата, которая не обладает в существенной степени значимой гомологией (или идентичностью последовательности) с пептидами, получаемыми из любых известных продуктов генов человека, отличных от KNTC2;

(iii) приведения пептида, состоящего из последовательности-кандидата, отобранной на стадии (ii), в контакт с антигенпрезентирующей клеткой

(iv) приведения антигенпрезентирующей клетки после стадии (iii) в контакт с CD8-положительной Т-клеткой, и

(v) идентификации пептида, способность к индукции CTL которого является такой же, как у пептида, состоящего из исходной последовательности аминокислот, или более высокой;

[22] Фармацевтическая композиция, содержащая пептид по любому из [1]-[5];

[23] Пептид по любому из [1]-[5] для применения в качестве лекарственного средства; и

[24] Полинуклеотид по [6] или вектор по [18] для применения в качестве лекарственного средства.

[0029] Альтернативно, настоящая заявка также относится к приведенным ниже вариантам осуществления:

[1] Выделенный пептид со способностью к индукции цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), где CTL, индуцируемые пептидов обладают специфической цитотоксической активностью против клеток, презентующих фрагмент, получаемый из KNTC2, и

кроме того, где пептид содержит последовательность аминокислот (а) или (b) ниже:

(а) последовательность аминокислот иммунологически активного фрагмента KNTC2;

(b) последовательность аминокислот, в которой в последовательности аминокислот иммунологически активного фрагмента KNTC2 заменены, удалены, вставлены и/или добавлены 1, 2 или несколько аминокислот,

[2] Пептид по [1], где пептид содержит последовательность аминокислот (а) или (b) ниже:

(а) последовательность аминокислот, выбранная из SEQ ID NO: 2, 3, 7, 17, 41, 53 и 68;

(b) последовательность аминокислот, в которой в последовательности аминокислот, выбранной из SEQ ID NO: 2, 3, 7, 17, 41, 53 и 68, заменены, введены, удалены и/или добавлены 1, 2 или несколько аминокислот;

[3] Пептид по [2], где пептид обладает одной или обеими из следующих характеристик:

(а) вторая аминокислота от N-конца представляет собой лейцин или метионин; и

(b) С-концевая аминокислота представляет собой валин или лейцин;

[4] Пептид по любому из [1]-[3], где пептид представляет собой нонапептид или декапептид;

[5] Выделенный полинуклеотид, кодирующий пептид по любому из [1]-[4];

[6] Композиция для индукции CTL, где композиция содержит по меньшей мере один активный ингредиент, выбранный из:

(а) пептида по любому из [1]-[4];

(b) полинуклеотида по [5];

(с) антигенпрезентирующей клетки (APC), которая презентирует на своей поверхности пептид по любому из [1]-[4]; и

(d) экзосомы, которая презентирует на своей поверхности пептид по любому из [1]-[4];

[7] Фармацевтическая композиция для лечения и/или профилактики первичной злокачественной опухоли и/или профилактики ее метастатического или послеоперационного рецидива или индукции иммунного ответа против указанной злокачественной опухоли, где композиция содержит по меньшей мере один активный ингредиент, выбранный из:

(а) пептида по любому из [1]-[4];

(b) полинуклеотида по [5];

(с) APC, которая презентирует на своей поверхности пептид по любому из [1]-[4];

(d) экзосомы, которая презентирует на своей поверхности пептид по любому из [1]-[4]; и

(е) CTL, который может распознавать клетку, презентирующую пептид по любому из [1]-[4];

[8] Фармацевтическая композиция по [7], где фармацевтическую композицию формулируют для введения индивидууму, антиген HLA которого представляет собой HLA-A2;

[9] Способ индукции APC со способностью к индукции CTL, где способ включает стадию, выбранную из:

(а) приведения APC в контакт с пептидом по любому из [1]-[4], и

(b) введения полинуклеотида, кодирующего пептид по любому из [1]-[4], в APC;

[10] Способ индукции CTL, где способ включает стадию, выбранную из:

(а) совместного культивирования CD8-положительной Т-клетки с APC, которая презентирует на своей поверхности комплекс антигена HLA и пептида по любому из

[1]-[4];

(b) совместного культивирования CD8-положительной Т-клетки с экзосомой, которая презентует на своей поверхности комплекс антигена HLA и пептида по любому из [1]-[4]; и

5 (с) введения в CD8-положительную Т-клетку полинуклеотида, кодирующего обе субъединицы Т-клеточного рецептора (TCR), или полинуклеотидов, кодирующих каждую из субъединиц TCR, где TCR, сформированный указанными субъединицами, способен связываться с комплексом пептида по любому из [1]-[4] и антигена HLA на клеточной поверхности;

10 [11] Выделенная APC, которая презентует на своей поверхности комплекс антигена HLA и пептида по любому из [1]-[4];

[12] APC по [12], индуцируемая способом по [9];

[13] Выделенный CTL, который нацелен на пептид по любому из [1]-[4];

[14] CTL по [14], индуцируемый способом по [10];

15 [15] Способ индукции иммунного ответа против злокачественной опухоли у индивидуума, где способ включает стадию введения индивидууму композиции, содержащей пептид по любому из [1]-[4], или полинуклеотид, кодирующий этот пептид;

[16] Антитело или его иммунологически активный фрагмент против пептида по любому из [1]-[4];

20 [17] Вектор, содержащий последовательность нуклеотидов, кодирующую пептид по любому из [1]-[4];

[18] Клетка-хозяин, трансформированная или трансфицированная вектором по [17];

[19] Диагностический набор, содержащий пептид по любому из [1]-[4], полинуклеотид по [5] или антитело или иммунологически активный фрагмент по [16]; и

25 [20] Способ скрининга пептида, обладающего способностью к индукции CTL, которые обладают специфической цитотоксической активностью против клеток, которые презентуют фрагмент, получаемый из KNTC2, где способ включает стадии:

(i) предоставления последовательности-кандидата, содержащей последовательность аминокислот, модифицированную заменой, удалением, встраиванием и/или добавлением
30 одного, двух или нескольких аминокислотных остатков в исходной последовательности аминокислот, где исходная последовательность аминокислот выбрана из SEQ ID NO: 2, 3, 7, 17, 41, 53 и 68;

(ii) отбора последовательности-кандидата, которая не обладает в существенной степени значимой гомологией с пептидами, получаемыми из любых известных продуктов
35 генов человека, отличных от KNTC2;

(iii) приведения пептида, содержащего последовательность-кандидата, отобранную на стадии (ii), в контакт с антигенпрезентирующей клеткой;

(iv) приведения антигенпрезентирующей клетки после стадии (iii) в контакт с CD8-положительной Т-клеткой, и

40 (v) идентификации пептида, способность к индукции CTL которого является такой же, как у пептида, содержащего исходную последовательность аминокислот, или более высокой;

[21] Фармацевтическая композиция, содержащая пептид по любому из [1]-[4];

[22] Пептид по любому из [1]-[4] для применения в качестве лекарственного средства;

45 и

[23] Полинуклеотид по [5] или вектор по [17] для применения в качестве лекарственного средства.

[0030] Задачи и признаки изобретения станут более понятными при чтении

приведенного ниже подробного описания совместно с сопровождающими фигурами и примерами. Следует понимать, что как предыдущий раздел "Сущность настоящего изобретения", так и следующее ниже подробное описание, являются только иллюстративными вариантами осуществления и не являются ограничивающими настоящее изобретение или другие альтернативные варианты осуществления настоящего изобретения.

[0031] В частности, хотя изобретение в настоящем документе описано со ссылкой на ряд конкретных вариантов осуществления, следует понимать, что это описание является иллюстративным описанием изобретения, и его не следует понимать как ограничивающее изобретение. Специалисты в данной области могут находить различные модификации и применения, не выходя за рамки сущности и объема изобретения, как указано в прилагаемой формуле изобретения. Подобным образом, другие задачи, признаки, эффекты и преимущества будут очевидными из описанных ниже сущности изобретения и определенных вариантов осуществления, и специалист в данной области легко поймет их. Такие задачи, признаки, эффекты и преимущества изобретения станут понятны из указанного выше совместно с сопровождающими примерами, данными, фигурами и разумными выводами, извлеченными из них, отдельно или с рассмотрением включенных в настоящий документ ссылок.

Краткое описание чертежей

[0032] Различные аспекты и применения настоящего изобретения станут очевидными специалисту в данной области после рассмотрения краткого описания фигур и подробного описания настоящего изобретения и его предпочтительных вариантов осуществления, которые следуют далее.

[Фиг. 1] Фигура 1 состоит из ряда фотографий, (a)-(h), изображающих результаты анализа способом иммуноферментных пятен (ELISPOT) интерферона (IFN) гамма на CTL, которые индуцировали пептидами, полученными из KNTC2. CTL в лунке № 8, стимулируемые KNTC2-A02-9-131 (SEQ ID NO: 2) (a), № 4, стимулируемые KNTC2-A02-9-181 (SEQ ID NO: 3) (b), № 7, стимулируемые KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO: 7) (c), № 5, стимулируемые KNTC2-A02-9-127 (SEQ ID NO: 17) (d), № 3, стимулируемые KNTC2-A02-10-127 (SEQ ID NO: 41) (e), № 2, стимулируемые KNTC2-A02-10-322 (SEQ ID NO: 53), (f) и № 6, стимулируемые KNTC2-A02-10-185 (SEQ ID NO: 68) (g), продемонстрировали сильную продукцию IFN-гамма по сравнению с контролем, соответственно. Квадрат на лунке на этих изображениях означает, что клетки из соответствующей лунки размножали для получения линий CTL. В противоположность этому, в качестве характерного случая отрицательных данных, специфической продукции IFN-гамма CTL, стимулированными KNTC2-A02-9-330 (SEQ ID NO: 1) (h), не наблюдали. На фигурах "+" означает продукцию IFN-гамма против клеток-мишеней, сенсibilизированных соответствующим пептидом, и "-" означает продукцию IFN-гамма против клеток-мишеней, не сенсibilизированных какими-либо пептидами.

[Фиг. 2] Фигура 2 состоит из ряда линейных графиков, (a)-(c), отображающих продукцию IFN-гамма линиями CTL, стимулируемыми KNTC2-A02-9-131 (SEQ ID NO: 2) (a), KNTC2-A02-9-181 (SEQ ID NO: 3) (b) и KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO: 7) (c). Количество IFN-гамма, которое продуцировали CTL, измеряли твердофазным иммуноферментным анализом (ELISA) для IFN-гамма. Результаты демонстрируют, что линии CTL, получаемые стимуляцией каждым пептидом, демонстрируют эффективную продукцию IFN-гамма по сравнению с контролем. На фигурах "+" означает продукцию IFN-гамма против клеток-мишеней, сенсibilизированных соответствующим пептидом, и "-" означает продукцию IFN-гамма против клеток-мишеней, не сенсibilизированных

какими-либо пептидами. Отношение R/S означает отношение числа иммунокомпетентных клеток (линии CTL) к клеткам-стимуляторам.

[Фиг. 3] На фигуре 3 представлена продукция IFN-гамма клонами CTL, получаемыми лимитирующим разведением из линий CTL, стимулированных KNTC2-A02-9-131 (SEQ ID NO: 2) (a), KNTC2-A02-9-181 (SEQ ID NO: 3) (b) и KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO: 7) (c). Результаты демонстрируют, что клоны CTL, получаемые стимуляцией каждым пептидом, продемонстрировали сильную продукцию IFN-гамма по сравнению с контролем. На фигурах "+" означает продукцию IFN-гамма против клеток-мишеней, сенсibilизированных соответствующим пептидом и "-" означает продукцию IFN-гамма против клеток-мишеней, не сенсibilизированных какими-либо пептидами. Отношение R/S означает отношение числа иммунокомпетентных клеток (клона CTL) к клеткам-стимуляторам.

[Фиг. 4] Фигура 4 представляет собой линейный график, изображающий специфическую активность клонов CTL против клеток-мишеней, которые экспрессируют KNTC2 и HLA-A*0201. В качестве контроля получали клетки COS7, трансфицированные HLA-A*0201 или полноразмерным геном KNTC2. Линия CTL, получаемая с использованием KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO: 7), продемонстрировала специфическую активность CTL против клеток COS7, трансфицированных KNTC2 и HLA-A*0201 (черный ромб). С другой стороны, не детектировали значимой специфической активности CTL против клеток COS7, трансфицированных HLA-A*0201 (треугольник) или KNTC2 (круг).

Описание вариантов осуществления

[0033] Хотя в практике или тестировании вариантов осуществления настоящего изобретения можно использовать любые способы и материалы, подобные или эквивалентные способам и материалам, описанным в настоящем документе, далее описаны предпочтительные способы, устройства и материалы. Однако перед описанием этих материалов и способов следует понимать, что эти описания являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения. Также следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается описанными в настоящем документе конкретными размерами, формами, размерностями, методологиями, протоколами и т.д., так как они могут варьироваться в соответствии с общепринятым экспериментированием и оптимизацией. Также следует понимать, что терминология, используемая в настоящем документе, предназначена только для целей описания конкретных версий или вариантов осуществления и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, который будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения.

[0034] Описания каждой публикации, патента или заявки на патент, указанные в настоящем описании изобретения, конкретно полностью включены в настоящий документ в качестве ссылки. Однако ничто в настоящем документе не следует понимать как признание того, что это изобретение не дает права на датирование задним числом такого раскрытия на основании предыдущего изобретения.

[0035] Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, что и значение, как правило, понимаемое специалистом в области, к которой принадлежит настоящее изобретение. В случае противоречия следует руководствоваться данным описанием изобретения, в том числе определениями. Кроме того, эти материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения.

[0036] I. Определения

Как используют в настоящем документе, если конкретно не указано иное, термины

в форме единственного числа означают "по меньшей мере один".

[0037] Термины "выделенный" и "очищенный", используемые в отношении вещества (например, пептида, антитела, полинуклеотида и т.д.), указывают, что вещество по существу не содержит по меньшей мере одного вещества, которое еще может содержаться в природном источнике. Таким образом, выделенным или очищенным пептидом называют пептид, который по существу не содержит клеточный материал, такой как углевод, липид или другие загрязняющие белки из источника клеток или ткани, из которого получен пептид, или по существу не содержит химических предшественников или других химических веществ при химическом синтезе. Термин "по существу не содержит клеточный материал" включает препараты пептида, в которых пептид отделен от клеточных компонентов тех клеток, из которых он выделен или рекомбинантно получен. Таким образом, пептид, который по существу не содержит клеточный материал, включает препараты полипептида, содержащие менее чем приблизительно 30%, 20%, 10% или 5% (в расчете на сухую массу) гетерологичного белка (также называемого "загрязняющим белком"). При рекомбинантном получении пептида, он также предпочтительно по существу не содержит среды для культивирования, что включает препараты пептида со средой для культивирования в количестве приблизительно 20%, 10% или 5% объема этого препарата пептида. При получении пептида химическим синтезом, он предпочтительно по существу не содержит химических предшественников или других химических веществ, включающих препараты пептида с химическими предшественниками или другими химическими веществами, участвующими в синтезе этого пептида, в количестве менее чем приблизительно 30%, 20%, 10%, 5% (в расчете на сухую массу) объема этого препарата пептида. То, что конкретный препарат пептида содержит выделенный или очищенный пептид, может быть показано, например, появлением единственной полосы после электрофореза препарата белка в (ДСН)-полиакриламидном геле и окрашиванием Кумасси бриллиантовым синим или т.п. этого геля. В одном предпочтительном варианте осуществления пептиды и полинуклеотиды по настоящему изобретению являются выделенными или очищенными.

[0038] Термины "полипептид", "пептид" и "белок" используют в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения полимера из аминокислотных остатков. Термины применяют к полимерам аминокислот, в которых один или более аминокислотных остатков могут представлять собой модифицированный остаток(ки) или не встречающийся в природе остаток, такой как искусственный химический миметик(и) соответствующей встречающейся в природе аминокислоты(от), а также к встречающимся в природе полимерам аминокислот.

[0039] Как используют в настоящем документе, термин "олигопептид" относится к пептиду, который состоит из 20 аминокислотных остатков или менее, как правило, 15 аминокислотных остатков или менее. Как используют в настоящем документе, термин "нонапептид" относится к пептиду, который состоит из 9 аминокислотных остатков, а термин "декапептид" относится к пептиду, который состоит из 10 аминокислотных остатков.

[0040] Как используют в настоящем документе, термин "аминокислота" относится к встречающимся в природе и синтетическим аминокислотам, а также аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые функционируют сходно с встречающимися в природе аминокислотами. Аминокислоты могут представлять собой L-аминокислоты или D-аминокислоты. Встречающиеся в природе аминокислоты представляют собой аминокислоты, кодируемые в генетическом коде, а также

аминокислоты, модифицированные после трансляции в клетках (например, гидроксипролин, гамма-карбоксиглутамат и О-фосфосерин). Фраза "аналог аминокислоты" относится к соединениям, которые имеют одну и ту же базовую химическую структуру (альфа-углерод, связанный с водородом, карбоксигруппой, 5 аминок группой и R-группой), что и встречающаяся в природе аминокислота, но имеют модифицированную R-группу или модифицированный каркас (например, гомосерин, норлейцин, метионин, сульфоксид, метионинметилсульфоний). Фраза "миметик аминокислоты" относится к химическим соединениям, которые имеют отличающиеся структуры, но сходные с основными аминокислотами функции.

10 [0041] Аминокислоты в настоящем описании могут быть обозначены их общеизвестными трехбуквенными символами или однобуквенными символами, рекомендуемыми IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission.

[0042] Термины "полинуклеотид", "олигонуклеотид" и "нуклеиновая кислота" используются в настоящем документе взаимозаменяемо, и если конкретно не указано 15 иное, их обозначают с использованием их общепринятых однобуквенных кодов.

[0043] Термины "средство", "вещество" и "композиция" используются в настоящем документе взаимозаменяемо в отношении продукта, который содержит указанные ингредиенты в указанных количествах, а также любого продукта, который происходит 20 прямо или косвенно из комбинации указанных ингредиентов в указанных количествах.

Такой термин при использовании в отношении модификации "фармацевтической" (как в "фармацевтическом средстве" и "фармацевтической композиции") предназначен 25 включать продукт, в том числе активный ингредиент(ы) и инертный ингредиент(ы), которые составляют этот носитель, а также любой продукт, который происходит прямо или косвенно из объединения, комплексообразования или агрегации любых двух или более ингредиентов, или из диссоциации одного или более ингредиентов, или из других типов реакций или взаимодействий одного или более ингредиентов. Таким образом, в контексте настоящего изобретения термины "фармацевтическое средство" и "фармацевтическая композиция" относятся к любому продукту, получаемому 30 смешиванием молекулы или соединения по настоящему изобретению и фармацевтически или физиологически приемлемого носителя.

[0044] Термин "активный ингредиент" в настоящем документе относится к веществу в средстве или композиции, которое является биологически или физиологически активным. В частности, в контексте фармацевтического средства или композиции, термин "активный ингредиент" относится к содержащемуся веществу, которое 35 демонстрирует объективное фармакологическое действие. Например, в случае фармацевтических средств или композиций для использования в лечении или профилактике злокачественной опухоли, активные ингредиенты в средствах или композициях могут приводить по меньшей мере к одному биологическому или физиологическому действию на злокачественные клетки и/или ткани прямо или 40 опосредованно. Предпочтительно, такое действие может включать уменьшение или ингибирование роста злокачественных клеток, повреждение или цитолиз злокачественных клеток и/или тканей и т.д. Как правило, непрямыми действиями активных ингредиентов являются индукция CTL, распознающих или вызывающих цитолиз злокачественных клеток. Перед составлением "активный ингредиент" может 45 также называться "основной массой", "лекарственным веществом" или "техническим продуктом".

[0045] Как используют в настоящем документе, фраза "фармацевтически приемлемый носитель" или "физиологически приемлемый носитель" означает фармацевтически или

физиологически приемлемый материал, композицию, вещество или носитель, включая, но, не ограничиваясь ими, жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, эксципиент, растворитель и инкапсулирующий материал.

[0046] В определенных вариантах осуществления фармацевтические средства или композиции по настоящему изобретению находят конкретное применение в качестве вакцин. В контексте настоящего изобретения термин "вакцина" (также обозначаемая как "иммуногенная композиция") относится к средству или композиции, которые обладают функцией улучшения, усиления и/или индукции противоопухолевого иммунитета после инокуляции животным.

[0047] Если не определено иначе, термин "злокачественная опухоль" относится к злокачественным опухолям или опухолям, которые сверхэкспрессируют ген KNTC2, примеры которых включают, но не ограничиваются ими, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, холангиокарциному, хронический миелолейкоз (CML), колоректальный рак, рак пищевода, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), лимфому, остеосаркому, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечно-клеточный рак, мелкоклеточный рак легких (SCLC) и опухоль мягких тканей.

[0048] Если не определено иначе, термины "цитотоксический Т-лимфоцит", "цитотоксическая Т-клетка" и "CTL" используются в настоящем документе взаимозаменяемо и, если не указано иначе, относятся к подгруппе Т-лимфоцитов, которые способны распознавать не-свои клетки (например, опухолевые клетки, инфицированные вирусом клетки) и индуцировать гибель таких клеток.

[0049] Если не определено иначе, термин "HLA-A2", как используют в настоящем документе, относится репрезентативно к подтипам, примеры которых включают, но не ограничиваются ими, HLA-A*0201, HLA-A*0202, HLA-A*0203, HLA-A*0204, HLA-A*0205, HLA-A*0206, HLA-A*0207, HLA-A*0210, HLA-A*0211, HLA-A*0213, HLA-A*0216, HLA-A*0218, HLA-A*0219, HLA-A*0228 и HLA-A*0250.

[0050] Если не определено иначе, термин "набор" используют в настоящем документе по отношению к комбинации реагентов и других материалов. В настоящем описании предусмотрено, что набор может содержать микропанель (микрочип), чип, маркер и т.д. Не следует понимать, что термин "набор" ограничен конкретной комбинацией реагентов и/или материалов.

[0051] Как используют в настоящем документе по отношению к индивидууму или пациенту, фраза "HLA-антигеном индивидуума (или пациента) является HLA-A2" относится к индивидууму или пациенту, несущему ген антигена HLA-A2 в гомозиготе или гетерозиготе, и антиген HLA-A2 экспрессирован в клетках этого индивидуума или пациента в качестве HLA-антигена.

[0052] В тех случаях, когда способы и композиции по настоящему изобретению находят применение в рамках "лечения" злокачественной опухоли, лечение считается "эффективным", если оно приводит к клинической эффективности, уменьшению размера, распространенности или метастатического потенциала злокачественной опухоли у индивидуума, увеличению времени выживания, подавлению метастатического или послеоперационного рецидива рака и т.д. При профилактическом применении лечения "эффективное" означает, что лечение замедляет или предотвращает возникновение злокачественной опухоли или предотвращает, или облегчает клинический симптом злокачественной опухоли. Эффективность определяют любым известным способом диагностики или лечения конкретного типа опухоли.

[0053] В тех случаях, когда способы и композиции по настоящему изобретению

находят применение в рамках "предотвращения" и "профилактики" злокачественной опухоли, такие термины в настоящем описании используются взаимозаменяемо в отношении любой активности, которая снижает смертность и заболеваемость, связанные с заболеванием. Предотвращение и профилактика могут проходить "на первичном, вторичном и третичном уровнях предотвращения". В то время как первичные предотвращение и профилактика устраняют возможность развития заболевания, вторичный и третичный уровни предотвращения и профилактики включают виды активности, направленные на предотвращение и профилактику прогрессирования заболевания и появления симптомов, а также уменьшение отрицательного действия уже развившегося заболевания посредством восстановления функции и уменьшения связанных с заболеванием осложнений. Альтернативно, предотвращение и профилактика могут включать в себя широкий диапазон профилактических способов лечения, направленных на облегчение тяжести конкретного нарушения, например, уменьшение пролиферации и метастазирования опухолей.

[0054] В контексте настоящего изобретения лечение и/или профилактика злокачественной опухоли и/или профилактика метастатического или послеоперационного рецидива рака включают любую активность, которая приводит к указанным ниже событиям, таким как хирургическое удаление злокачественных клеток, ингибирование роста злокачественных клеток, инволюция или регресс опухоли, индукция ремиссии и подавление частоты возникновения злокачественной опухоли, регрессия опухоли и снижение или ингибирование метастазирования, подавление послеоперационного рецидива рака и увеличение времени выживания. Эффективное лечение и/или профилактика злокачественной опухоли снижает смертность и улучшает прогноз у индивидуумов, страдающих злокачественной опухолью, снижает уровни опухолевых маркеров в крови и ослабляет детектируемые симптомы, сопутствующие злокачественной опухоли. Например, эффективное лечение включает уменьшение или улучшение симптомов, и/или профилактика включает 10%, 20%, 30% или большее уменьшение или достижение стабильного состояния заболевания.

[0055] В контексте настоящего изобретения термин "антитело" относится к иммуноглобулинам и их фрагментам, которые являются специфически реакционно-способными в отношении указанного белка или его пептида. Антитело может включать антитела человека, приматизированные антитела, химерные антитела, биспецифические антитела, гуманизированные антитела, антитела, слитые с другими белками или радиоактивными метками, и фрагменты антител. Кроме того, антитело в настоящем описании используют в самом широком смысле, и оно конкретно включает интактные моноклональные антитела, поликлональные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), образованные по меньшей мере из двух интактных антител и фрагментов антител, при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность. "Антитело" означает все классы (например, IgA, IgD, IgE, IgG и IgM).

[0056] Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же самое значение, что и значение, как правило, понимаемое специалистом в области, к которой принадлежит настоящее изобретение.

[0057] II. Пептиды:

Пептиды по настоящему изобретению, подробно описанные ниже, могут быть обозначены как "пептид(ы) KNTC2" или "полипептид(ы) KNTC2".

[0058] Для демонстрации того, что пептиды, получаемые из KNTC2, функционируют как антиген, распознаваемый CTL, пептиды, получаемые из KNTC2 (SEQ ID NO: 79),

анализировали для определения того, являлись ли они антигенными эпитопами, рестриктированными по HLA-A2, которые, как правило, обнаруживают с аллелями HLA (Date Y. et al., *Tissue Antigens*, 47: 93-101, 1996; Kondo A. et al., *J. Immunol.*, 155: 4307-12, 1995; Kubo R.T. et al., *J. Immunol.*, 152: 3913-24, 1994).

[0059] Кандидаты связывающих HLA-A2 пептидов, получаемых из KNTC2, идентифицировали на основании их аффинностей связывания с HLA-A2.

Идентифицированы следующие пептиды: SEQ ID NO: 2-76.

[0060] Из приведенного к успешному получению CTL привели приведенные ниже пептиды, после стимуляции *in vitro* Т-клеток дендритными клетками (DC), сенсibilизированными (нагруженными) этими пептидами, CTL успешно получали с использованием каждого из следующих пептидов:

KNTC2-HLA-A02-9-131 (SEQ ID NO: 2), KNTC2-HLA-A02-9-181 (SEQ ID NO: 3), KNTC2-HLA-A02-9-184 (SEQ ID NO: 7), KNTC2-HLA-A02-9-127 (SEQ ID NO: 17), KNTC2-HLA-A02-10-127 (SEQ ID NO: 41), KNTC2-HLA-A02-10-322 (SEQ ID NO: 53) и KNTC2-HLA-A02-10-185 (SEQ ID NO: 68).

[0061] Полученные CTL, указанные выше, продемонстрировали сильную специфическую активность CTL против клеток-мишеней, сенсibilизированных соответствующими пептидами. Эти результаты демонстрируют, что KNTC2 является антигеном, распознаваемым CTL, и что приведенные выше пептиды являются пептидами-эпитопами KNTC2, рестриктированными по HLA-A2; таким образом, такие пептиды могут быть эффективными при иммунотерапии злокачественных опухолей для положительных по HLA-A2 пациентов вследствие индукции цитотоксичности посредством CTL.

[0062] Так как ген KNTC2 сверхэкспрессирован в злокачественных клетках и тканях, включающих, например, клетки и ткани рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака шейки матки, холангиокарциномы, хронического миелолейкоза (CML), колоректального рака, рака пищевода, немелкоклеточного рака легких (NSCLC), лимфомы, остеосаркомы, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточного рака, мелкоклеточного рака легких (SCLC) и опухоли мягких тканей, и не экспрессируется в большинстве нормальных органов, он представляет собой хорошую мишень для иммунотерапии. Таким образом, настоящее изобретение относится к нонапептидам (пептидам, состоящим из девяти аминокислотных остатков) и декапептидам (пептидам, состоящим из десяти аминокислотных остатков), соответствующим распознаваемым CTL эпитомам из KNTC2. Альтернативно, настоящее изобретение относится к выделенным пептидам, которые могут индуцировать CTL, где пептид состоит из иммунологически активного фрагмента KNTC2. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к пептидам, содержащим последовательность аминокислот, выбранную из SEQ ID NO: 2, 3, 7, 17, 41, 53 и 68. В предпочтительных вариантах осуществления пептиды по настоящему изобретению представляют собой нонапептиды или декапептиды, содержащие последовательность аминокислот, выбранную из SEQ ID NO: 2, 3, 7, 17, 41, 53 и 68. Предпочтительные примеры пептидов по настоящему изобретению включают пептиды, состоящие из последовательностей аминокислот, выбранных из SEQ ID NO: 2, 3, 7, 17, 41, 53 и 68.

[0063] Пептиды по настоящему изобретению, в частности, нонапептиды и декапептиды по настоящему изобретению, могут быть фланкированы дополнительными остатками аминокислот при условии, что получаемые пептиды сохраняют свою способность к индукции CTL. Конкретные дополнительные остатки аминокислот могут состоять из любого типа аминокислот при условии, что они не уменьшают способность

исходного пептида к индукции CTL. Таким образом, настоящее изобретение также относится к пептидам, обладающим способностью к индукции CTL, в частности пептидам, получаемым из KNTC2. Такие пептиды содержат, например, приблизительно менее 40 аминокислот, часто приблизительно менее 20 аминокислот и, как правило, приблизительно менее 15 аминокислот.

[0064] Общеизвестно, что модификация одной, двух или нескольких аминокислот в пептиде не влияет на функцию этого пептида или, в некоторых случаях, даже усиливает желаемую функцию исходного пептида. Фактически, известно, что модифицированные пептиды (т.е. пептиды, состоящие из последовательности аминокислот, в которой по сравнению с исходной эталонной последовательностью модифицированы (т.е. заменены, добавлены, удалены и/или вставлены) 1, 2 или несколько остатков аминокислот), сохраняют биологическую активность исходного пептида (Mark et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, 81:5662-6; Zoller and Smith, Nucleic Acids Res., 1982, 10:6487-500; Dalbadie-McFarland et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, 79:6409-13). Таким образом, в одном из вариантов осуществления настоящего изобретения пептиды по настоящему изобретению обладают способностью к индукции CTL и содержат последовательность аминокислот, выбранную из SEQ ID NO: 2, 3, 7, 17, 41, 53 и 68, в которой добавлены, удалены, введены и/или заменены одна, две или даже более аминокислот. Другими словами, пептиды по настоящему изобретению обладают способностью к индукции CTL и содержат последовательность аминокислот, в которой в последовательности аминокислот, выбранной из SEQ ID NO: 2, 3, 7, 17, 41, 53 и 68, заменены, удалены, вставлены и/или добавлены одна, две или несколько аминокислот, при условии, что модифицированные пептиды сохраняют способность к индукции CTL исходного эталонного пептида.

[0065] Специалистам в данной области понятно, что отдельные модификации (т.е. делеции, вставки, добавления или замены) последовательности аминокислот, которые изменяют одну аминокислоту или небольшой процент от всей последовательности аминокислот, как правило, сохраняют свойства боковой цепи исходной аминокислоты. Таким образом, их традиционно называют "консервативными заменами" или "консервативными модификациями", где изменение белка приводит к белку со сходными с исходным белком функциями. В данной области известны таблицы консервативных замен, в которых представлены функционально сходные аминокислоты. Примеры характеристик боковых цепей аминокислот, которые желательно сохранять, включают, например: гидрофобные аминокислоты (A, I, L, M, F, P, W, Y, V), гидрофильные аминокислоты (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T) и боковые цепи со следующими функциональными группами или характеристиками в целом: алифатическая боковая цепь (G, A, V, L, I, P); гидроксильная группа, содержащая боковую цепь (S, T, Y); атом серы, содержащий боковую цепь (C, M); карбоксильная кислота и амидсодержащая боковая цепь (D, N, E, Q); содержащая основание боковая цепь (R, K, H) и содержащая ароматическую группу боковая цепь (H, F, Y, W). Кроме того, каждая из следующих восьми групп содержит аминокислоты, которые в данной области приемлемы в качестве консервативных замен друг друга:

- 1) аланин (A), глицин (G);
- 2) аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E);
- 3) аспарагин (N), глутамин (Q);
- 4) аргинин (R), лизин (K);
- 5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V);
- 6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W);
- 7) серин (S), треонин (T); и

8) цистеин (C), метионин (M) (см., например, Creighton, Proteins 1984).

[0066] Полагают, что такие консервативно модифицированные пептиды также являются пептидами по настоящему изобретению. Однако пептиды по настоящему изобретению не ограничены ими и могут содержать неконсервативные модификации при условии, что получаемый модифицированный пептид сохраняет требуемую способность исходного немодифицированного пептида к индукции CTL. Кроме того, модифицированные пептиды не должны исключать способные к индукции CTL пептиды, получаемые из полиморфных вариантов, межвидовых гомологов и аллелей KNTC2.

[0067] Остатки аминокислот можно вставлять, заменять и/или добавлять к пептидам по настоящему изобретению или, альтернативно, остатки аминокислот можно удалять из них с получением более высокой аффинности связывания. Для сохранения необходимой способности к индукции CTL специалист в данной области предпочтительно модифицирует (т.е. удаляет, вставляет, добавляет и/или заменяет) только небольшое число (например, 1, 2 или несколько) или небольшой процент аминокислот. В настоящем документе термин "несколько" означает 5 или менее аминокислот, например, 4 или 3 или менее. Процент аминокислот, которые необходимо модифицировать, может составлять, например, 30% или менее, предпочтительно 20% или менее, более предпочтительно 15% или менее и даже более предпочтительно 10% или менее, например, 1-5%.

[0068] При использовании в контексте иммунотерапии злокачественных опухолей пептиды по настоящему изобретению могут быть презентированы на поверхности клетки или экзосомы в виде комплекса с HLA-антигеном. Таким образом, предпочтительно выбирать пептиды, которые не только индуцируют CTL, но также обладают и высокой аффинностью связывания с HLA-антигеном. С этой целью пептиды можно модифицировать посредством замены, вставки, удаления и/или добавления остатков аминокислот с получением модифицированного пептида с улучшенной аффинностью связывания с HLA-антигеном. В дополнение к пептидам, которые презентированы в природе, вследствие того, что закономерность последовательностей пептидов, презентируемых посредством связывания с HLA-антигенами, уже известна (Kubo RT et al., J. Immunol. 1994, 152: 3913-24; Rammensee HG et al., Immunogenetics 1995, 41: 178-228; Kondo et al., J. Immunol. 1994, 155: 4307-12; Falk K, et al., Nature. 1991 May 23; 351(6324):290-6.) в иммуногенных пептидах по настоящему изобретению можно проводить модификации, основанные на такой закономерности.

[0069] Например, у пептидов с высокой аффинностью связывания с HLA-A2 существует тенденция замены второй с N-конца аминокислоты на лейцин или метионин и/или аминокислоты на С-конце на валин или лейцин. Таким образом, для повышения аффинности связывания с HLA-A2 желательной может являться замена второй аминокислоты с N-конца на лейцин или метионин, и/или на С-конце на валин или лейцин. Таким образом, пептиды, содержащие последовательность аминокислот, выбранную из SEQ ID NO: 2, 3, 7, 17, 41, 53 и 68, в которой вторую аминокислоту с N-конца последовательности аминокислот SEQ ID NO заменяют на лейцин или метионин, и/или где С-конец последовательности аминокислот SEQ ID NO заменен на валин или лейцин, находятся в объеме настоящего изобретения. Кроме того, настоящее изобретение относится к пептидам, содержащим последовательность аминокислот, в которой в SEQ ID NO: 2, 3, 7, 17, 41, 53 и 68 и 58 заменены, удалены, вставлены и/или добавлены одна, две или несколько аминокислот, где такие пептиды обладают одной или обеими следующими характеристиками: (a) вторая аминокислота с N-конца представляет собой лейцин или метионин, и (b) аминокислота на С-конце представляет собой валин или

лейцин. В предпочтительных вариантах осуществления пептиды по настоящему изобретению содержат последовательность аминокислот, в которой в последовательности аминокислот SEQ ID NO: 2, 3, 7, 17, 41, 53 и 68 вторую аминокислоту с N-конца заменяют на лейцин или метионин и/или аминокислоту на C-конце заменяют на валин или лейцин.

[0070] Замены можно вносить не только в концевые аминокислоты, но также и в положения участков потенциального распознавания пептидов Т-клеточным рецептором (TCR). Несколько исследований продемонстрировали, что пептид с заменами аминокислот может обладать эквивалентной или лучшей функцией, чем функция исходного белка, например, CAP1, p53₍₂₀₄₋₂₇₂₎, Her-2/neu₍₃₆₉₋₃₇₇₎ или gp100₍₂₀₉₋₂₁₇₎ (Zaremba et al. Cancer Res., 57, 4570-4577, 1997, T.K. Hoffmann et al., J. Immunol., (2002) Feb 1; 168 (3):1338-47., S. O. Dionne et al., Cancer Immunol. Immunother., (2003) 52: 199-206 и S. O. Dionne et al., Cancer Immunology Immunotherapy, (2004) 53, 307-314).

[0071] В Настоящем изобретении также предусмотрено добавление 1, 2 или нескольких аминокислот на N- и/или C-конце пептидов по настоящему изобретению. Такие модифицированные пептиды, сохраняющие способность к индукции CTL, также находятся в объеме настоящего изобретения.

[0072] Например, настоящее изобретение относится к выделенному пептиду длиной менее чем 15, 14, 13, 12, 11 или 10 аминокислот, который обладает способностью к индукции CTL и последовательностью аминокислот, выбранной из группы, состоящей из:

(i) последовательность аминокислот, в которой в последовательности аминокислот, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3, 7 и 17, модифицированы 1, 2 или несколько аминокислот,

(ii) последовательность аминокислот (i), где последовательность аминокислот обладает одной или обеими следующими характеристиками:

(a) вторая аминокислота с N-конца указанных SEQ ID NO представляет собой или модифицирована так, чтобы представлять собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из лейцина и метионина; и

(b) C-концевая аминокислота указанных SEQ ID NO представляет собой или модифицирована так, чтобы представлять собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из валина и лейцина.

[0073] Кроме того, настоящее изобретение также относится к выделенному пептиду длиной менее чем 15, 14, 13, 12 или 11 аминокислот, который обладает способностью к индукции CTL и последовательностью аминокислот, выбранной из группы, состоящей из:

(i') последовательности аминокислот, в которой в последовательности аминокислот, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 41, 53 и 68, модифицированы 1, 2 или несколько аминокислот

(ii') последовательность аминокислот (i'), где последовательность аминокислот обладает одной или обеими следующими характеристиками:

(a) вторая аминокислота с N-конца указанных SEQ ID NO представляет собой или модифицирована так, чтобы представлять собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из лейцина и метионина; и

(b) C-концевая аминокислота указанных SEQ ID NO представляет собой или модифицирована так, чтобы представлять собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из валина и лейцина.

Когда эти пептиды приводят в контакт или вводят в APC, эти пептиды

процессируются в APC с презентацией на них пептида, выбранного из группы, состоящей из (i)-(iv) и (i')-(iv').

[0074] Однако, когда последовательность пептида является идентичной части последовательности аминокислот эндогенного или экзогенного белка с отличающейся функцией, могут быть индуцированы неблагоприятные побочные эффекты, такие как аутоиммунные нарушения и/или аллергические симптомы против конкретных веществ. Таким образом, сначала может являться желательным проведение исследования гомологии с использованием доступных баз данных во избежание ситуаций, в которых последовательность пептида совпадает с последовательностью аминокислот другого белка. Когда после исследования гомологии становится ясно, что в природе по сравнению с заданным пептидом не существует пептида, идентичного или содержащего 1 или 2 отличающихся аминокислоты, заданный пептид можно модифицировать для повышения его аффинности связывания с HLA-антигенами и/или для повышения его способности к индукции CTL без какого-либо риска таких побочных эффектов.

[0075] Хотя ожидается, что пептиды, обладающие высокой аффинностью связывания с HLA-антигенами, являются высокоэффективными, пептиды-кандидаты, которые выбраны по наличию высокой аффинности связывания в качестве индикатора, далее анализируют на наличие способности к индукции CTL. В настоящем документе фраза "способность к индукции CTL" означает способность пептида индуцировать цитотоксические Т-лимфоциты (CTL) при презентации на антигенпрезентирующих клетках (APC). Кроме того, "способность к индукции CTL" включает способность пептида индуцировать активацию CTL, пролиферацию CTL, стимулировать лизис CTL клеток-мишеней и увеличивать продукцию CTL IFN-гамма.

[0076] Подтверждение способности к индукции CTL проводят индукцией APC (антигенпрезентирующих клеток), несущих MHC-антигены человека (например, В-лимфоцитов, макрофагов и дендритных клеток (DC)), или более конкретно DC, получаемых из моноклеарных лейкоцитов периферической крови человека, и после стимуляции APC тестируемыми пептидами, смешиванием APC с CD8-положительными Т-клетками для индукции CTL, а затем измерением IFN-гамма против клеток-мишеней, продуцируемого и высвобождаемого CTL. В качестве реакционной системы можно использовать трансгенных животных, полученных для экспрессии HLA-антигена человека (например, таких, как описаны у BenMohamed L et al., Hum. Immunol., 2000, 61 (8): 764-79, Related Articles, Books, Linkout Induction of CTL response by minimal epitope vaccine in HLA A*0201/DR1 transgenic mice: dependence on HLA class II restricted T(H) response). Альтернативно, клетки-мишени можно метить радиоактивным ⁵¹Cr и т.п., и можно рассчитывать цитотоксическую активность CTL на основании радиоактивности, высвобождаемой из этих клеток-мишеней. Альтернативно, способность к индукции CTL можно оценивать посредством измерения продукции и высвобождения CTL IFN-гамма в присутствии антигенпрезентирующих клеток (APC), которые несут иммобилизованные пептиды, и посредством визуализации зоны ингибирования на среде с использованием моноклональных антител к IFN-гамма.

[0077] В дополнение к описанным выше модификациям пептиды по настоящему изобретению также можно связывать с другими пептидами при условии, что получаемый связанный пептид сохраняет необходимую способность исходного пептида к индукции CTL, и более предпочтительно также сохраняет необходимую его активность связывания с HLA. Примеры "других" подходящих пептидов включают: пептиды по настоящему изобретению или способные к индукции CTL пептиды, получаемые из других ТАА. Пептид по настоящему изобретению можно связывать с одним или несколькими

"другими" пептидами прямо или опосредованно посредством линкера. Межпептидные линкеры хорошо известны в данной области и включают, например, AAY (P. M. Daftarian et al., J. Trans. Med. 2007, 5:26), AAA, NKRR (R. P. M. Suttmuller et al., J. Immunol. 2000, 165: 7308-7315) или K (S. Ota et al., Can. Res. 62, 1471-1476, K. S. Kawamura et al., J. Immunol. 2002, 168: 5709-5715).

[0078] Описанные выше связанные пептиды названы в настоящем документе "политопами", т.е. группами из двух или более потенциально иммуногенных или стимулирующих иммунный ответ пептидов, которые могут быть соединены вместе в различных конфигурациях (например, последовательно, с перекрытием). Политоп (или нуклеиновую кислоту, кодирующую политоп) можно вводить в соответствии со стандартным протоколом иммунизации, например, животным для тестирования эффективности политопа при стимуляции, усилении и/или вызове иммунного ответа.

[0079] Пептиды можно связывать вместе непосредственно или посредством использования фланкирующих последовательностей с формированием политопов, и использование политопов в качестве вакцин хорошо известно в данной области (см., например, Thomson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92(13):5845-5849, 1995; Gilbert et al., Nature Biotechnol., 15(12):1280-1284, 1997; Thomson et al., J. Immunol., 157(2):822-826, 1996; Tarn et al., J. Exp. Med., 171(1):299-306, 1990). Политопы, содержащие различные количества и различные комбинации эпитопов, можно получать и тестировать в отношении распознавания CTL и в отношении эффективности повышения иммунного ответа.

[0080] Пептиды по настоящему изобретению также можно связывать с другими веществами, при условии, что получаемый связанный пептид сохраняет необходимую способность исходного пептида к индукции CTL. Примеры подходящих веществ включают, например: пептиды, липиды, сахар и цепи сахаров, ацетильные группы, природные и синтетические полимеры и т.д. Пептиды могут содержать модификации, такие как гликозилирование, окисление или фосфорилирование боковой цепи и т.д., при условии, что модификации не нарушают биологическую активность исходного пептида. Эти типы модификаций можно проводить для придания дополнительных функций (например, функции нацеливания и функции доставки) или для стабилизации пептида.

[0081] Например, в данной области известно, что для увеличения стабильности пептида *in vivo* вводят D-аминокислоты, миметики аминокислот или неприродные аминокислоты; эту концепцию также можно адаптировать для пептидов по настоящему изобретению. Стабильность пептида можно анализировать рядом способов. Например, для тестирования стабильности можно использовать пептидазы и различные биологические среды, такие как плазма и сыворотка человека (см., например, Verhoef et al., Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokin., 1986, 11: 291-302).

[0082] Кроме того, как указано выше, среди модифицированных пептидов, в которых заменены, удалены, вставлены или добавлены 1, 2 или несколько остатков аминокислот, можно проводить скрининг или отбор на пептиды с такой же или более высокой активностью по сравнению с исходными пептидами. Таким образом, настоящее изобретение также относится к способу скрининга или отбора модифицированных пептидов с такой же или более высокой активностью по сравнению с исходными пептидами. Иллюстративный способ включает стадии:

а: модификации (замены, удаления, вставки и/или добавления) в пептиде по настоящему изобретению по меньшей мере одного остатка аминокислоты,

б: определения активности пептида, модифицированного на стадии а, и

с: отбора пептида с такой же или более высокой активностью по сравнению с исходным пептидом.

[0083] В настоящем документе оцениваемая активность может включать активность связывания МНС, способность к индукции APC или CTL и цитотоксическую активность. Предпочтительно, оцениваемой активностью пептида является способность к индукции CTL.

[0084] В предпочтительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу скрининга пептида, обладающего способностью индуцировать CTL, который обладает специфической цитотоксической активностью против клетки, которая презентует фрагмент, получаемый из KNTC2, где способ включает стадии:

(i) предоставления последовательности-кандидата, состоящей из последовательности аминокислот, модифицированной посредством замены, удаления, вставки и/или добавления в исходной последовательности аминокислот одного, двух или нескольких остатков аминокислот, где исходная последовательность аминокислот выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3, 7, 17, 41, 53 и 68;

(ii) отбора последовательности-кандидата, которая не имеет существенной значимой гомологии (или идентичности последовательности) с пептидами, получаемыми из продуктов любых известных генов человека, отличных от KNTC2;

(iii) приведения пептида, состоящего из последовательности-кандидата, отобранной на стадии (ii), в контакт с антигенпрезентирующей клеткой;

(iv) приведения антигенпрезентирующей клетки после стадии (iii) в контакт с CD8-положительной Т-клеткой, и

(v) идентификации пептида, способность к индукции CTL которого является такой же или более высокой, чем у пептида, состоящего из исходной последовательности аминокислот.

[0085] Когда пептиды по настоящему изобретению содержат остаток цистеина (например, SEQ ID NO: 7), пептиды имеют тенденцию к формированию димеров посредством дисульфидной связи между группами SH остатков цистеина. Таким образом, в настоящее изобретение включены димеры пептидов, обладающих способностью к индукции CTL. Димер пептидов по настоящему изобретению может быть сформирован посредством связывания двух мономеров пептидов KNTC2 посредством дисульфидной связи между остатками цистеина, находящимися или добавленными в мономерах. Когда последовательность аминокислот каждого пептида содержит остаток цистеина (Cys), между такими остатками цистеина может формироваться дисульфидная связь с формированием олигомерного пептида по настоящему изобретению. Альтернативно, если последовательность аминокислот сама не содержит цистеина, дисульфидная связь может формироваться между остатками цистеина, которые добавляют в такую последовательность аминокислот. Например, для формирования дисульфидной связи остаток(ки) цистеина в такой пептид можно вводить на одном из или на обоих его С- и N-концах. Кроме того, один или несколько остатков цистеина также можно вставлять внутри последовательности аминокислот каждого пептида.

[0086] III. Получение пептидов KNTC2

Пептиды по настоящему изобретению можно получать хорошо известными способами. Например, пептиды можно получать синтетически с использованием технологии рекомбинантных ДНК или химического синтеза. Пептиды по настоящему изобретению можно синтезировать индивидуально или в виде более длинных полипептидов, состоящих из двух или более пептидов. Затем пептиды можно выделять, то есть очищать или выделять таким образом, чтобы они по существу не содержали

других природных белков клетки-хозяина и их фрагментов или любых других химических веществ.

[0087] Пептиды по настоящему изобретению могут содержать модификации, такие как гликозилирование, окисление или фосфорилирование боковой цепи, при условии, что такие модификации не устраняют биологическую активность исходного пептида. Другие иллюстративные модификации включают введение одной или нескольких D-аминокислот или других миметиков аминокислот, которые можно использовать, например, для увеличения времени полувыведения пептидов из сыворотки.

[0088] Пептиды по настоящему изобретению можно получать химическим синтезом на основе выбранной последовательности аминокислот. Например, общепринятые способы пептидного синтеза, которые можно адаптировать для синтеза, включают:

(i) Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966;

(ii) The Proteins, Vol. 2, Academic Press, New York, 1976;

(iii) Peptide Synthesis (in Japanese), Maruzen Co., 1975;

(iv) Basics and Experiment of Peptide Synthesis (in Japanese), Maruzen Co., 1985;

(v) Development of Pharmaceuticals (second volume) (in Japanese), Vol. 14 (peptide synthesis), Hirokawa, 1991;

(vi) WO99/67288, и

(vii) Barany G. & Merrifield R.B., Peptides Vol. 2, "Solid Phase Peptide Synthesis", Academic Press, New York, 1980, 100-118.

[0089] Альтернативно, пептиды по настоящему изобретению можно получать, адаптируя любые известные способы генетической инженерии для получения пептидов (например, Morrison J., J. Bacteriology, 1977, 132:349-51; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (eds Wu et al.) 1983, 101:347-62). Например, сначала получают подходящий вектор, несущий полинуклеотид, кодирующий заданный пептид в экспрессируемой форме (например, после регуляторной последовательности, соответствующей последовательности промотора), и трансформируют в подходящую клетку-хозяина. Такие векторы и клетки-хозяева также могут быть предоставлены в настоящем изобретении. Затем эту клетку-хозяина культивируют для получения представляющего интерес пептида. Пептид также можно получать *in vitro*, адаптируя систему трансляции *in vitro*.

[0090] Когда пептиды по настоящему изобретению представляют собой димеры пептидов, такие димеры можно получать известным в данной области способом. Например, если мономеры пептидов содержат одну пару остатков цистеина, димер пептидов можно получать, например, удаляя все защитные группы, включая защитные группы на боковых цепях цистеинов, а затем подвергая полученный раствор мономеров окислению на воздухе в щелочных условиях или добавляя окислитель в щелочных или кислых условиях с формированием дисульфидной связи. Примеры окислителей включают йод, диметилсульфоксид (DMSO) и феррицианид калия.

[0091] Способом, как описано выше, также можно получать мономеры пептидов, содержащие два или более остатков цистеина. В этом случае получают изомеры с различными типами дисульфидных связей. С другой стороны посредством выбора комбинации защитных групп для боковых цепей цистеина можно получать димер пептидов, в котором дисульфидная связь сформирована между конкретными остатками цистеина. Примеры комбинаций защитных групп включают комбинации MeBzl (метилбензильной) группы и Acm (ацетамидметильной) группы, Trt (третилльной) группы и Acm группы, Npys (3-нитро-2-пиридилтио) группы и Acm группы и S-Bu-t (S-трет-бутильной) группы и Acm группы. Например, в случае комбинации MeBzl группы и

Асм группы, получение димера пептидов можно проводить посредством удаления MeBzl группы и защитной группы, отличной от защитной группы на боковой цепи цистеина, подвергая полученный раствор мономеров окислению на воздухе с формированием дисульфидной связи между остатками цистеина со снятой защитой, а затем снимая защиту и проводя окисление с использованием йода с формированием дисульфидной связи между остатками цистеина, ранее защищенных Асм.

[0092] IV. Полинуклеотиды:

Настоящее изобретение также относится к полинуклеотидам, которые кодируют любой из указанных выше пептидов по настоящему изобретению. Эти полинуклеотиды включают полинуклеотиды, получаемые из природного гена KNTC2 (например, номер доступа GenBank NM_006101 (SEQ ID NO: 77) или AF017790 (SEQ ID NO: 78)), а также полинуклеотидам с консервативно модифицированными последовательностями их нуклеотидов. В настоящем документе фраза "консервативно модифицированная последовательность нуклеотидов" относится к последовательностям, которые кодируют идентичные или по существу идентичные последовательности аминокислот. Вследствие вырожденности генетического кода, любой конкретный белок кодирует большое количество функционально идентичных нуклеиновых кислот. Например, все кодоны GCA, GCC, GCG и GCU кодируют аминокислоту аланин. Таким образом, в каждом положении, где аланин указан посредством кодона, кодон можно изменять на любой из соответствующих описанных кодонов без изменения кодируемого полипептида. Такие вариации нуклеиновых кислот являются "молчащими вариациями", которые являются одним из видов консервативно модифицированных вариаций. В настоящем документе в каждой последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует пептид, также описана каждая возможная молчащая вариация нуклеиновой кислоты. Специалисту в данной области понятно, что каждый кодон в нуклеиновой кислоте (за исключением AUG, который, как правило, является единственным кодоном для метионина, и TGG, который, как правило, является единственным кодоном для триптофана) можно модифицировать с получением функционально идентичной молекулы. Таким образом, каждая молчащая вариация нуклеиновой кислоты, которая кодирует пептид, полностью описана в каждой предоставленной последовательности.

[0093] Полинуклеотиды по настоящему изобретению могут состоять из ДНК, РНК и их производных. Как хорошо известно в данной области, ДНК соответственно состоит из оснований, таких как А, Т, С и Г, а в РНК Т заменен на U. Специалисту в данной области понятно, что в полинуклеотиды также можно вводить основания, не встречающиеся в природе.

[0094] Полинуклеотиды по настоящему изобретению могут кодировать несколько пептидов по настоящему изобретению с промежуточными последовательностями аминокислот или без них. Например, промежуточная последовательность аминокислот может обеспечивать участок расщепления (например, последовательность, распознаваемую ферментом) полинуклеотида или транслируемых пептидов. Кроме того, полинуклеотид по настоящему изобретению в кодирующей последовательности, кодирующей пептид по настоящему изобретению, может содержать любые дополнительные последовательности. Например, полинуклеотид по настоящему изобретению может представлять собой рекомбинантный полинуклеотид, который содержит регуляторные последовательности, необходимые для экспрессии этого пептида, или может представлять собой экспрессирующий вектор (плазмиду) с маркерным геном и т.п. Как правило, такие рекомбинантные полинуклеотиды можно получать посредством манипуляции с полинуклеотидами общепринятыми рекомбинантными

способами, например, с использованием полимераз и эндонуклеаз.

[0095] Для получения полинуклеотидов по настоящему изобретению можно использовать как рекомбинантные способы, так и способы химического синтеза.

Например, полинуклеотиды по настоящему изобретению можно получать посредством вставки в подходящий вектор, который может экспрессироваться после трансфекции в компетентную клетку. Альтернативно, полинуклеотиды по настоящему изобретению можно амплифицировать способами ПЦР или экспрессии в подходящих хозяевах (см., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989). Альтернативно, полинуклеотид по настоящему изобретению можно синтезировать твердофазными способами, как описано у Beaucage SL & Iyer RP, *Tetrahedron* 1992, 48:2223-311; Matthes et al., *EMBO J.* 1984, 3:801-5.

[0096] V. Экзосомы

Настоящее изобретение дополнительно относится к внутриклеточным везикулам, называемым экзосомами, которые презентируют на своей поверхности комплексы, формируемыми пептидами по настоящему изобретению и HLA-антигенами. Экзосомы можно получать, например, способами, подробно описанными в публикации патентной заявки Японии № H11-510507 и WO99/03499, и можно получать с использованием APC, получаемых у пациентов, которых подвергают лечению и/или профилактике. Экзосомы по настоящему изобретению можно инокулировать в виде вакцин способом, сходным способом для пептидов по настоящему изобретению.

[0097] Тип HLA-антигенов, включаемых в эти комплексы, должен соответствовать типу HLA-антигенов индивидуума, которому необходимы лечение и/или профилактика. Например, в японской популяции часто преобладают HLA-A2, в частности HLA-A*0201 и HLA-A*0206, и, таким образом, они будут подходящими для лечения японских пациентов. Применение типа HLA-A2, который часто экспрессируется в японской и европеоидной популяциях, является благоприятствующим для получения эффективных результатов, а также применение находят подтипы, такие как HLA-A*0201 и HLA-A*0206. Как правило, в клинике тип HLA-антигена пациента, которому необходимо лечение, исследуют заранее, что позволяет сделать подходящий выбор пептидов с высокими уровнями аффинности связывания с конкретным антигеном или способных к индукции CTL, посредством презентации антигена. Кроме того, для получения пептидов с высокой аффинностью связывания и способностью к индукции CTL, можно проводить замену, вставку, удаление или добавление 1, 2 или нескольких аминокислот на основании последовательности аминокислот природного неполного пептида KNTC2.

[0098] При использовании типа HLA-A24 антигена HLA для экзосомы по настоящему изобретению особой ценностью обладают пептиды с последовательностью аминокислот, выбранной из SEQ ID NO: 2, 3, 7, 17, 41, 53 и 68.

[0099] В определенных вариантах осуществления экзосомы по настоящему изобретению презентируют на своей поверхности комплекс пептида по настоящему изобретению и антигена HLA-A2.

[0100] VI. Антигенпрезентирующие клетки (APC):

Настоящее изобретение также относится к выделенным антигенпрезентирующим клеткам (APC), которые презентируют на своей поверхности комплексы, образованные между HLA-антигенами и пептидами по настоящему изобретению. APC можно получать у пациентов, которых подвергают лечению и/или профилактике, и их можно вводить в виде вакцин сами по себе или в комбинации с другими лекарственными средствами, содержащими пептиды, экзосомы или CTL по настоящему изобретению.

[0101] APC не ограничены конкретным видом клеток и включают дендритные клетки

(DC), клетки Лангерганса, макрофаги, В-клетки и активированные Т-клетки, для которых известно, что они презентруют белковые антигены на своей клеточной поверхности таким образом, чтобы их распознавали лимфоциты. Поскольку DC являются репрезентативными APC с самой сильной индуцирующей CTL активностью среди APC, DC являются подходящими для APC по настоящему изобретению.

[0102] Например, APC по настоящему изобретению можно получать индукцией DC из моноцитов периферической крови, а затем приведением (стимулированием) их в контакт с пептидами по настоящему изобретению *in vitro*, *ex vitro* или *in vivo*. При введении пептидов по настоящему изобретению индивидуумам в организме индивидуума индуцируются APC, которые презентуют пептиды по настоящему изобретению. Таким образом, APC по настоящему изобретению можно получать путем сбора APC у индивидуума после введения индивидууму пептидов по настоящему изобретению. Альтернативно, APC по настоящему изобретению можно получать путем приведения APC, собранных у индивидуума, в контакт с пептидом по настоящему изобретению.

[0103] APC по настоящему изобретению можно вводить индивидууму для индукции иммунного ответа против злокачественной опухоли у индивидуума сами по себе или в комбинации с другими лекарственными средствами, содержащими пептиды, экзосомы или CTL по настоящему изобретению. Например, введение *ex vivo* может включать стадии:

а: сбора APC у первого индивидуума;

б: приведения APC после стадии а в контакт с пептидом по настоящему изобретению и

с: введения APC после стадии б второму индивидууму.

Первый индивидуум и второй индивидуум могут представлять собой одного и того же индивидуума или могут представлять собой различных индивидуумов. APC, получаемые на стадии б, можно формулировать и вводить вакцину для лечения и/или профилактики таких злокачественных опухолей, как рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, холангиокарцинома, хронический миелолейкоз (CML), колоректальный рак, рак пищевода, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), лимфома, остеосаркома, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечно-клеточный рак, мелкоклеточный рак легких (SCLC) и опухоль мягких тканей, но не ограничиваясь ими.

[0104] В контексте настоящего изобретения можно использовать пептиды по настоящему изобретению для получения фармацевтической композиции для индукции APC. В настоящем изобретении также предоставлен способ или процесс получения фармацевтической композиции для индукции APC, где способ включает стадию смешивания или составления пептида по настоящему изобретению с фармацевтически приемлемым носителем.

Настоящее изобретение также относится к использованию пептидов по настоящему изобретению для индукции APC.

[0105] По одному из аспектов настоящего изобретения APC по настоящему изобретению обладают способностью к индукции CTL. В отношении APC фраза "способность к индукции CTL" относится к способности APC индуцировать CTL при контакте с CD8-положительной Т-клеткой. Кроме того, "способность к индукции CTL" включает способность APC индуцировать активацию CTL, пролиферацию CTL, способствовать опосредуемому CTL лизису клетки-мишени и повышать продукцию IFN-гамма CTL. В частности, APC по настоящему изобретению обладают способностью индуцировать CTL, специфичные к KNTC2. Такие APC с высоким уровнем способности

к индукции CTL можно получать способом, который включает стадию переноса полинуклеотида, кодирующего пептид по настоящему изобретению, в APC *in vitro*, а также способом, упомянутым выше. Вводимый ген может находиться в форме ДНК или РНК. Примеры способов введения без конкретных ограничений включают различные способы, обычно используемые в данной области, такие как липофекция, электропорация и способ с использованием фосфата кальция. Более конкретно, его можно проводить, как описано в Reeves ME et al., Cancer Res. 1996, 56: 5672-7; Butterfield LH et al., J. Immunol. 1998, 161: 5607-13; Boczkowski D et al., J. Exp. Med. 1996, 184: 465-72; в патентной публикации Японии № 2000-509281. При переносе гена в APC, ген в клетке подвергается транскрипции, трансляции и т.д., а затем получаемый белок процессируется посредством МНС класса I или класса II, и проходит через путь презентации до неполных пептидов по настоящему изобретению. Альтернативно, APC по настоящему изобретению можно получать способом, который включает стадию простого приведения APC в контакт с пептидом по настоящему изобретению.

В определенных вариантах осуществления APC по настоящему изобретению презентуют на своей поверхности комплексы антигена HLA-A2 и пептида по настоящему изобретению.

[0106] VII. Цитотоксические Т-лимфоциты (CTL):

CTL, индуцированные против любого из пептидов по настоящему изобретению, усиливают иммунный ответ, направленный на злокачественные клетки *in vivo*, и, таким образом, их можно использовать в качестве вакцины аналогичным образом, как сами пептиды. Таким образом, настоящее изобретение относится к выделенным CTL, которые являются специфически индуцированными или активированными любым из пептидов по настоящему изобретению.

[0107] Такие CTL можно получать посредством (1) введения индивидууму пептида (ов) по настоящему изобретению, (2) приведением получаемых у индивидуума APC и CD8-положительных клеток или моноклеарных лейкоцитов периферической крови в контакт (стимулированием) с пептидом(ами) по настоящему изобретению *in vitro*, (3) приведением CD8-положительных клеток или моноклеарных лейкоцитов периферической крови в контакт с APC или экзосомами, презентующими комплекс HLA-антигена и пептида на своей поверхности *in vitro* или (4) введением в CD8-положительную Т-клетку полинуклеотида, кодирующего обе субъединицы Т-клеточного рецептора (TCR), или полинуклеотидов, кодирующих каждую из субъединиц TCR, где TCR, формируемый такими субъединицами, может связываться с комплексом пептида по настоящему изобретению и HLA-антигена на клеточной поверхности. Такие APC или экзосомы можно получать способами, описанными выше. Подробное описание способа (4) описано ниже в разделе "VIII. Т-клеточный рецептор (TCR)".

[0108] CTL по настоящему изобретению можно получать у пациентов, которых подвергают лечению и/или профилактике, и их можно вводить сами по себе или в комбинации с другими лекарственными средствами, включая пептиды, APC или экзосомы по настоящему изобретению с целью регулирующего действия. Получаемые CTL специфически действуют против клеток-мишеней, презентующих пептиды по настоящему изобретению, или, например, те же пептиды, используемые для индукции. Клетки-мишени могут представлять собой клетки, эндогенно экспрессирующие KNTC2, такие как злокачественные клетки, или в качестве мишеней для атаки активированных CTL также могут служить клетки, которые трансфицированы геном KNTC2, и клетки которые презентуют на клеточной поверхности пептид по настоящему изобретению вследствие стимуляции пептидом.

[0109] В определенных вариантах осуществления CTL по настоящему изобретению представляют собой CTL, которые распознают клетки, презентирующие комплексы антигенов HLA-A2 и пептида по настоящему изобретению. В отношении CTL фраза "распознают клетку" относится к связыванию комплекса антигена HLA-A2 и пептида по настоящему изобретению на клеточной поверхности через их TCR и проявлению специфической цитотоксической активности против клетки. В настоящем документе "специфическая цитотоксическая активность" относится к проявлению цитотоксической активности против клетки, презентирующей комплекс антигена HLA-A2 и пептида по настоящему изобретению, но не против других клеток. Таким образом, в объем настоящего изобретения входят CTL, которые проявляют специфическую цитотоксическую активность против клеток, презентирующих пептид по настоящему изобретению. Конкретно, CTL по настоящему изобретению могут распознавать клетки, экспрессирующие KNTC2 и HLA-A2 (например, HLA-A2-положительную злокачественную клетку), и проявляют цитотоксическую активность против таких клеток.

[0110] VIII. Т-клеточный рецептор (TCR):

Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей один или несколько полинуклеотидов, кодирующих обе субъединицы TCR, или полинуклеотиды, кодирующие каждую из субъединиц TCR, где TCR, сформированный такими субъединицами, способен связываться с комплексом HLA-антигена и пептида по настоящему изобретению на клеточной поверхности. Также предусмотрен способ ее применения. Субъединицы TCR обладают способностью формировать TCR, которые придают специфичность Т-клеткам против опухолевых клеток, экспрессирующих KNTC2. Известными в данной области способами можно идентифицировать полинуклеотид, кодирующий каждую из альфа- и бета-цепей субъединиц TCR CTL, индуцированного одним или несколькими пептидами по настоящему изобретению (WO2007/032255 и Morgan R.A. et al., J. Immunol., 171, 3287 (2003)). Например, для анализа TCR предпочтительным является способ ПЦР. Праймеры для ПЦР для анализа могут представлять собой, например, праймеры 5'-R (5'-gtctaccaggcattcgcttcat-3') в качестве праймеров на 5'-конце (SEQ ID NO: 80) и праймеры 3-TRa-C (5'-tcagctggaccacagccgcagcgt-3'), специфичные к С-области альфа-цепи TCR (SEQ ID NO: 81), праймеры 3-TRb-C1 (5'-tcagaaatcctttctcttgac-3'), специфичные к C1-области бета-цепи TCR (SEQ ID NO: 82) или праймеры 3-TRbeta-C2 (5'-ctagcctctggaatcctttctctt-3'), специфичные к C2-области бета-цепи TCR (SEQ ID NO: 83), в качестве праймеров на 3'-конце, но не ограничиваются ими. Производные TCR могут с высокой авидностью связываться с клетками-мишенями, презентирующими пептид по настоящему изобретению, и необязательно опосредовать эффективный цитолиз клеток-мишеней, презентирующих пептид по настоящему изобретению in vivo и in vitro.

[0111] Полинуклеотид, кодирующий обе субъединицы TCR, или полинуклеотиды, кодирующие каждую из субъединиц TCR, можно вводить в подходящие векторы, например, ретровирусные векторы. Эти векторы хорошо известны в данной области. Полинуклеотиды или содержащие их векторы можно эффективно переносить в Т-клетку (например, CD8-положительную Т-клетку). Преимущественно, настоящее изобретение относится к готовой к использованию композиции, обеспечивающей быструю модификацию собственных Т-клеток пациента (или Т-клеток другого млекопитающего) с быстрым и простым получением модифицированных Т-клеток, обладающих превосходными свойствами цитолиза злокачественных клеток.

[0112] TCR, специфичные против пептидов по настоящему изобретению, должны

быть способны специфически распознавать комплекс пептида по настоящему изобретению и молекулы HLA, обеспечивая специфическую активность Т-клеток против клеток-мишеней, презентирующих комплекс пептида по настоящему изобретению и HLA-антигена, когда TCR презентированы на поверхности Т-клетки. Специфичное
 5 распознавание указанного выше комплекса можно подтверждать любыми известными способами, предпочтительные примеры которых включают анализ окрашивания мультимеров HLA с использованием молекул HLA и пептидов по настоящему изобретению и анализ ELISPOT. Проводя анализ ELISPOT, можно подтверждать, что Т-клетка, экспрессирующая TCR на клеточной поверхности, распознает клетку
 10 посредством TCR, и что сигналы передаются внутриклеточно. Подтверждение того, что указанный выше TCR может обеспечивать цитотоксическую активность Т-клеток, когда TCR присутствует на поверхности Т-клеток, также можно проводить любым известным способом. Предпочтительный способ включает, например, определение цитотоксической активности против клетки-мишени, такое как анализ высвобождения
 15 хрома.

[0113] Также настоящее изобретение относится к CTL, которые получают посредством трансдукции полинуклеотидами, кодирующими обе субъединицы TCR, или полинуклеотидами, кодирующими каждую из субъединиц TCR, где TCR, формируемый такими субъединицами TCR, способен связываться с пептидом KNTC2, например, SEQ
 20 ID NO: 2, 3, 7, 17, 41, 53 и 68, в комплексе с HLA-A2.

[0114] Трансдуцированные CTL способны к хомингу к злокачественным клеткам *in vivo*, и их можно наращивать хорошо известными способами культивирования *in vitro* (например, Kawakami et al., J. Immunol., 142, 3452-3461 (1989)). CTL по настоящему изобретению изобретения можно использовать для получения иммуногенной
 25 композиции, пригодной для лечения или предотвращения злокачественной опухоли у пациента, нуждающегося в терапии или защите (см. WO2006/031221, содержание которой включено в настоящий документ в качестве ссылки).

[0115] IX. Фармацевтические композиции:

Так как экспрессия KNTC2 в злокачественных опухолях, примеры которых включают,
 30 но не ограничиваются ими, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, холангиокарциному, хронический миелолейкоз (CML), колоректальный рак, рак пищевода, мелкоклеточный рак легких (NSCLC), лимфому, остеосаркому, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечно-клеточный рак, мелкоклеточный рак легких (SCLC) и опухоль мягких тканей, специфически
 35 повышена по сравнению с нормальными тканями, пептиды или полинуклеотиды по настоящему изобретению можно использовать для индукции иммунного ответа против злокачественных опухолей или опухолевых клеток, и, таким образом, они служат для лечения и/или профилактики злокачественных опухолей и/или профилактики их метастатического или послеоперационного рецидива. Таким образом, настоящее
 40 изобретение относится к фармацевтическим композициям или средствам, формулируемым для лечения и/или профилактики злокачественных опухолей и/или для профилактики их метастатического или послеоперационного рецидива, где такие композиции или средства содержат по меньшей мере один из пептидов или полинуклеотидов по настоящему изобретению в качестве активного ингредиента.
 45 Альтернативно, пептиды по настоящему изобретению можно экспрессировать на поверхности любой из указанных выше экзосом или клеток, таких как APC, для использования в качестве фармацевтических композиций или средств. Кроме того, в качестве активного ингредиента фармацевтических композиций или средств по

настоящему изобретению также можно использовать указанные выше CTL, которые направлены на любой из пептидов по настоящему изобретению.

[0116] Таким образом, настоящее изобретение относится к средствам или композициям, содержащим по меньшей мере один активный ингредиент, выбранный из:

- (a) пептида по настоящему изобретению;
- (b) полинуклеотида, кодирующего пептид по настоящему изобретению в экспрессируемой форме;
- (c) APC по настоящему изобретению;
- (d) или экзосомы по настоящему изобретению; и
- (e) CTL по настоящему изобретению.

[0117] В фармацевтической композиции или средстве, такие пептид, полинуклеотид, APC и CTL находятся в терапевтически или фармацевтически эффективном количестве.

Фармацевтические композиции или средства по настоящему изобретению также находят применение в качестве вакцины. В контексте настоящего изобретения фраза "вакцина" (также обозначаемая как "иммуногенная композиция") относится к средству или композиции, которые после инокуляции животному обладают функцией индукции противоопухолевого иммунитета. Другими словами, настоящее изобретение относится к фармацевтическим средствам и композициям для индукции у индивидуума иммунного ответа против злокачественной опухоли.

[0118] Фармацевтические композиции или средства по настоящему изобретению можно использовать для лечения и/или профилактики злокачественных опухолей и/или профилактики их метастатического или послеоперационного рецидива у индивидуумов или пациентов, включающих человека и любых других млекопитающих, включая, но, не ограничиваясь ими, мышей, крыс, морских свинок, кроликов, кошек, собак, овец, коз, свиней, крупный рогатый скот, лошадей, обезьян, бабуинов и шимпанзе, в частности, коммерчески важных животных или одомашненных животных. В определенных вариантах осуществления фармацевтические средства или композиции по настоящему изобретению можно формулировать для введения индивидууму, HLA-антиген которого представляет собой HLA-A2.

[0119] В другом варианте осуществления настоящее изобретение также относится к применению активного ингредиента для производства фармацевтической композиции или средства для лечения и/или профилактики злокачественных или опухолевых состояний и/или профилактики их метастатических или послеоперационных рецидивов, где указанный активный ингредиент выбран из:

- (a) пептида по настоящему изобретению;
- (b) полинуклеотида, кодирующего пептид по настоящему изобретению в экспрессируемой форме;
- (c) APC, презентирующей на своей поверхности пептид по настоящему изобретению;
- (d) экзосомы, презентирующей на своей поверхности пептид по настоящему изобретению; и
- (e) CTL по настоящему изобретению.

[0120] Альтернативно, настоящее изобретение дополнительно относится к активному ингредиенту для применения при лечении и/или профилактике злокачественных опухолей или опухолей и/или профилактики их послеоперационного рецидива, где указанный активный ингредиент выбран из:

- (a) пептида по настоящему изобретению;
- (b) полинуклеотида, кодирующего пептид по настоящему изобретению в

экспрессируемой форме;

(с) APC, презентирующей на своей поверхности пептид по настоящему изобретению;

(d) экзосомы, презентирующей на своей поверхности пептид по настоящему изобретению; и

5 (е) CTL по настоящему изобретению.

[0121] Альтернативно, настоящее изобретение дополнительно относится к способу или процессу производства фармацевтической композиции или средства для лечения и/или профилактики злокачественного или опухолевого состояний и/или профилактики их метастатических или послеоперационных рецидивов, где способ или процесс

10 включают стадию формулирования фармацевтически или физиологически приемлемого носителя с активным ингредиентом, выбранным из:

(a) пептида по настоящему изобретению;

(b) полинуклеотида, кодирующего пептид по настоящему изобретению в экспрессируемой форме;

15 (с) APC, презентирующей на своей поверхности пептид по настоящему изобретению;

(d) экзосомы, презентирующей на своей поверхности пептид по настоящему изобретению; и

(е) CTL по настоящему изобретению.

[0122] В другом варианте осуществления настоящее изобретение также относится к способу или процессу для производства фармацевтической композиции или средства для лечения и/или профилактики злокачественного или опухолевого состояний и/или профилактики их метастатических или послеоперационных рецидивов, где способ или процесс

20 включают стадии смешивания активного ингредиента с фармацевтически или физиологически приемлемым носителем, где активный ингредиент выбран из:

25 (a) пептида по настоящему изобретению;

(b) полинуклеотида, кодирующего пептид по настоящему изобретению в экспрессируемой форме;

(с) APC, презентирующей на своей поверхности пептид по настоящему изобретению;

30 (d) экзосомы, презентирующей на своей поверхности пептид по настоящему изобретению; и

(е) CTL по настоящему изобретению.

[0123] В другом варианте осуществления настоящее изобретение также относится к способу лечения и /или профилактики злокачественного или опухолевого состояний и/или профилактики их метастатических или послеоперационных рецидивов, где способ

35 включает стадию введения индивидууму по меньшей мере одного активного ингредиента, выбранного из:

(a) пептида по настоящему изобретению;

(b) полинуклеотида, кодирующего такой пептид по настоящему изобретению в экспрессируемой форме;

40 (с) APC, презентирующей на своей поверхности пептид по настоящему изобретению;

(d) экзосомы, презентирующей на своей поверхности пептид по настоящему изобретению; и

(е) CTL по настоящему изобретению.

[0124] По настоящему изобретению продемонстрировано, что пептиды с последовательностью аминокислот, выбранной из SEQ ID NO: 2, 3, 7, 17, 41, 53 и 68, представляют собой рестриктивные по HLA-A2 пептиды-эпитопы и, таким образом, служат в качестве кандидатов, которые могут индуцировать у индивидуума сильный и специфический иммунный ответ против злокачественной опухоли, экспрессирующей

HLA-A2 и KNTC2. Таким образом, фармацевтические композиции или средства, содержащие любой из этих пептидов с последовательностью аминокислот, выбранной из SEQ ID NO: 2, 3, 7, 17, 41, 53 и 68, особенно подходят для введения индивидуумам, антиген HLA которых представляет собой HLA-A2. Количество пептида в таких средстве
 5 или композиции может представлять собой количество, которое эффективно в отношении значимой индукции у индивидуума, со злокачественной опухолью, экспрессирующей KNTC2 и HLA-A2, сильного и специфического иммунного ответа. Это же применимо для фармацевтических композиций или средств, которые содержат полинуклеотиды, кодирующие любой из этих пептидов (т.е. полинуклеотиды по
 10 настоящему изобретению).

[0125] Злокачественные опухоли, подлежащие лечению и/или профилактике фармацевтическими композициями или средствами по настоящему изобретению, не ограничены и включают все типы злокачественных опухолей, где участвует KNTC2, примеры которых включают, но, не ограничиваются ими, рак мочевого пузыря, рак
 15 молочной железы, рак шейки матки, холангиокарциному, хронический миелолейкоз (CML), колоректальный рак, рак пищевода, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), лимфому, остеосаркому, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечно-клеточный рак, мелкоклеточный рак легких (SCLC) и опухоль мягких тканей. Предпочтительно, злокачественная опухоль экспрессирует HLA-A2 (т.е. является
 20 положительной по HLA-A2 злокачественной опухолью).

[0126] Фармацевтические композиции или средства по настоящему изобретению в дополнение к указанным выше активным ингредиентам могут содержать другие пептиды, которые обладают способностью индуцировать CTL против злокачественных
 25 клеток, полинуклеотиды, кодирующие такие пептиды, клетки, которые презентуют такие пептиды, или и т.п. Примеры таких "других" пептидов со способностью индуцировать CTL против злокачественных клеток, включают, но не ограничиваются ими, пептиды, получаемые из специфических для злокачественной опухоли антигенов (например, идентифицированных ТАА).

[0127] При необходимости фармацевтические композиции или средства по настоящему изобретению могут в качестве дополнительных активных ингредиентов необязательно
 30 содержать другие терапевтические вещества при условии, что вещество не ингибирует противоопухолевое действие активного ингредиента по настоящему изобретению, например, любого из пептидов, полинуклеотидов, экзосом, APC, CTL по настоящему изобретению. Например, составы могут содержать противовоспалительные вещества, болеутоляющие средства, химиотерапевтические средства и т.п. В дополнение к
 35 включению других терапевтических веществ в само лекарственное средство лекарственные средства по настоящему изобретению также можно вводить последовательно или одновременно с одним или несколькими другими фармакологическими композициями. Количества лекарственного средства и
 40 фармакологической композиции зависят, например, от того, какой используют тип фармакологической композиции(ий), от подлежащего лечению заболевания и от схемы и путей введения.

[0128] Специалистам в данной области понятно, что в дополнение к ингредиентам, конкретно указанным в настоящем документе, фармацевтические композиции или
 45 средство по настоящему изобретению в зависимости от типа рассматриваемого состава могут включать другие вещества, общепринятые в данной области.

[0129] В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения фармацевтические композиции или средства по настоящему изобретению можно

упаковывать в промышленные изделия и наборы, содержащие материалы, пригодные для лечения подлежащего лечению состояния заболевания, например, злокачественной опухоли. Промышленное изделие может содержать контейнер с любой из фармацевтических композиций или средств по настоящему изобретению с этикеткой.

5 Подходящие контейнеры включают бутылки, флаконы и тестовые пробирки. Контейнеры можно получать из различных материалов, таких как стекло или пластик. Этикетка на контейнере должна указывать композицию или средство, которое используют для лечения или профилактики одного или нескольких состояний заболевания. Этикетка также может содержать инструкции по введению и т.д.

10 [0130] В дополнение к описанному выше контейнеру набор, содержащий фармацевтическую композицию или средство по настоящему изобретению, может необязательно дополнительно содержать второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый разбавитель. Он может дополнительно содержать другие материалы, желательные с коммерческой или пользовательской точек зрения, включая
15 другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыш в упаковку с инструкциями по применению.

[0131] Фармацевтические композиции или средства по настоящему изобретению при желании можно помещать в упаковку или дозирующее устройство, которые могут содержать одну или более стандартных лекарственных форм, содержащих активный
20 ингредиент. Например, упаковка может содержать металлическую фольгу или полимерную пленку, такую как блистерная упаковка. Упаковка или дозирующее устройство может содержать инструкции по введению.

[0132] (1) Фармацевтические композиции, содержащие пептиды

Пептиды по настоящему изобретению можно вводить непосредственно в виде
25 фармацевтических композиций или средств или, при необходимости, можно формулировать общепринятыми способами составления. В последнем случае в дополнение к пептидам по настоящему изобретению при необходимости можно включать носители, эксципиенты и такие носители, которые, как правило, используют для лекарственных средств, без конкретных ограничений. Примеры таких носителей
30 включают, но не ограничиваются ими, стерилизованную воду, физиологический раствор, фосфатный буфер, жидкость для культивирования и т.д. Кроме того, фармацевтические композиции или средства по настоящему изобретению могут по мере необходимости содержать стабилизаторы, суспензии, консерванты, поверхностно-активные вещества и т.д. Фармацевтические композиции или средства по настоящему изобретению можно
35 использовать с целью противодействия злокачественным опухолям.

[0133] Пептиды по настоящему изобретению можно получать в комбинации, которая содержит два или несколько пептидов по настоящему изобретению, для индукции CTL *in vivo*. Пептиды могут находиться в форме смеси или их можно конъюгировать друг с другом стандартными способами. Например, пептиды можно химически связывать
40 или экспрессировать в виде одной слитой полипептида. Пептиды в комбинации могут являться одинаковыми или различными. При введении пептидов по настоящему изобретению пептиды с высокой плотностью презентируют HLA-антигены на APC, а затем происходит индукция CTL, которые специфически взаимодействуют с комплексом, образованным презентруемым пептидом и HLA-антигеном. Альтернативно, APC
45 (например, DC) можно получать у индивидуума, а затем стимулировать пептидами по настоящему изобретению с получением APC, которые презентируют на своей клеточной поверхности любой из пептидов по настоящему изобретению. Эти APC можно снова вводить индивидууму с индукцией у индивидуума CTL, и, в результате, можно повышать

агрессивность к опухолеассоциированному эндотелию.

[0134] Фармацевтические композиции или средства для лечения и/или профилактики злокачественной опухоли, содержащие любой из пептидов по настоящему изобретению в качестве активного ингредиента, также могут содержать адъювант, для того чтобы эффективно формировать клеточный иммунитет. Альтернативно, фармацевтические композиции или средства по настоящему изобретению можно вводить совместно с активными ингредиентами или можно вводить посредством формулирования в гранулы. Адъювант относится к любому соединению, веществу или композиции, которые усиливают иммунный ответ против белка при совместном (или последовательном) введении с белком с иммунологической активностью. Предусматриваемые в настоящем документе адъюванты включают адъюванты, описанные в литературе (Clin. Microbiol. Rev., 1994, 7: 277-89). Примеры подходящих адъювантов включают, но не ограничиваются ими, фосфат алюминия, гидроксид алюминия, квасцы, холерный токсин, токсин сальмонеллы, IFA (неполный адъювант Фрейнда), CFA (полный адъювант Фрейнда), ISCOMATRIX, GM-CSF, CpG, эмульсию м/в и т.п.

[0135] Кроме того, в целях удобства можно использовать липосомные составы, гранулярные составы, в которых пептид связан с гранулами диаметром несколько микрон, и составы, в которых липид связан с пептидом.

[0136] В другом варианте осуществления пептид по настоящему изобретению также можно вводить в форме фармацевтически приемлемой соли. Примеры предпочтительных солей включают, но не ограничиваются ими, соли с щелочными металлами, соли с металлами, соли с органическими основаниями, соли с аминами, соли с органическими кислотами (уксусной кислотой, муравьиной кислотой, пропионовой кислотой, фумаровой кислотой, малеиновой кислотой, янтарной кислотой, винной кислотой, лимонной кислотой, яблочной кислотой, щавелевой кислотой, бензойной кислотой, метансульфоновой кислотой и т.д.) и соли с неорганическими кислотами (соляной кислотой, фосфорной кислотой, бромистоводородной кислотой, серной кислотой, азотной кислотой и т.д.). Как используют в настоящем документе, фраза "фармацевтически приемлемая соль" относится к таким солям, которые сохраняют биологическое действие и свойства соединений и которые получают реакцией с неорганическими или органическими кислотами или основаниями, такими как хлористоводородная кислота, бромистоводородная кислота, серная кислота, азотная кислота, фосфорная кислота, метансульфоновая кислота, этансульфоновая кислота, пара-толуолсульфоновая кислота, салициловая кислота и т.п.

[0137] В определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции или средства по настоящему изобретению могут дополнительно содержать компонент, который примирует CTL. Липиды идентифицированы как компоненты, способные примировать CTL против вирусных антигенов *in vivo*. Например, остатки пальмитиновой кислоты можно связывать с epsilon- и альфа-аминогруппами остатка лизина, а затем связывать с пептидом по настоящему изобретению. Затем липидированный пептид можно вводить непосредственно в мицелле или частице, заключенной в липосоме или эмульгированной в адъюванте. В качестве других примеров липидов для примирования ответа CTL можно использовать липопротейны *E. coli*, такие как трипальмитоил-S-глицерилцистеинилсерилсерин (P3CSS), при ковалентном связывании с соответствующим пептидом (см., например, Deres et al., Nature, 1989, 342: 561-4).

[0138] Примеры подходящих способов введения включают, но не обязательно ограничены ими, пероральную и интрадермальную, подкожную, внутримышечную, внутрикостную, перитонеальную и внутривенную инъекцию или т.д. Введение может

представлять собой системное введение или местное введение (т.е. прямую инъекцию) рядом с намеченными участками. Введение можно проводить посредством однократного введения или усиливать посредством нескольких введений. Индивидууму с необходимостью в лечении злокачественной опухоли, экспрессирующей KNTC2, можно вводить фармацевтически или терапевтически эффективное количество пептида по настоящему изобретению. Альтернативно, индивидууму со злокачественной опухолью, экспрессирующей KNTC2, можно вводить количество пептида по настоящему изобретению, достаточное для индукции CTL против злокачественной опухоли или опухоли, экспрессирующей KNTC2. Дозу пептидов по настоящему изобретению можно регулировать соответствующим образом в соответствии с подлежащим лечению заболеванием, возрастом пациента, массой, способом введения и т.д., и, как правило, она составляет от 0,001 мг до 1000 мг, например, от 0,01 мг до 100 мг, например, от 0,1 мг до 30 мг, например, от 0,1 до 10 мг, например, от 0,5 мг до 5 мг, и ее можно вводить однократно в период от нескольких суток до нескольких месяцев, например, раз в неделю. Подходящие и оптимальные дозы может легко определить специалист в данной области.

[0139] (2) Фармацевтические композиции, содержащие полинуклеотиды

Фармацевтические композиции или средства по настоящему изобретению также могут содержать нуклеиновые кислоты, кодирующие пептиды, описываемые в настоящем документе, в экспрессируемой форме. В настоящем документе, фраза "в экспрессируемой форме" означает, что полинуклеотид при введении в клетку экспрессируется *in vivo* в виде полипептида, который индуцирует противоопухолевый иммунитет. В одном из иллюстративных вариантов осуществления последовательность нуклеиновой кислоты представляющего интерес полинуклеотида содержит регуляторные элементы, необходимые для экспрессии полинуклеотида. Полинуклеотид(ы) можно конструировать таким образом, чтобы обеспечивать стабильное встраивание в геном клетки-мишени (для описания касетных векторов для гомологичной рекомбинации см., например, Thomas K.R. & Capecchi M.R., Cell, 1987, 51:503-12). См., например, Wolff et al., Science, 1990, 247:1465-8; патенты США №№ 5580859, 5589466, 5804566, 5739118, 5736524, 5679647 и WO 98/04720. Примеры технологий доставки на основе ДНК включают "голую ДНК", облегченную (опосредованную бупивакаином, полимерами, пептидами) доставку, комплексы катионных липидов и опосредованную частицами ("генную пушку") или опосредованную давлением доставку (см., например, патент США № 5922687).

[0140] Пептиды по настоящему изобретению также могут экспрессировать вирусные или бактериальные вектора. Примеры экспрессирующих векторов включают аттенуированных вирусов-хозяев, таких как вирус коровьей оспы или вирус оспы кур. Этот подход включает использование вируса коровьей оспы, например, в качестве вектора для экспрессии последовательностей нуклеотидов, которые кодируют пептид. После введения хозяину рекомбинантный вирус коровьей оспы экспрессирует иммуногенный пептид и, таким образом, индуцирует иммунный ответ. Векторы на основе вируса коровьей оспы и способы, пригодные для протоколов иммунизации, описаны, например, в патенте США № 4722848. Другой вектор представляет собой BCG (бациллу Кальмета-Герена). Векторы на основе BCG описаны в Stover et al., Nature, 1991, 351: 456-60. Очевиден широкий спектр других векторов, пригодных для терапевтического введения или иммунизации, например, векторы на основе аденовирусов и аденоассоциированных вирусов, ретровирусные векторы, векторы на основе *Salmonella typhi*, векторы на основе обезвреженного токсина сибирской язвы и т.п. См., например,

Shata et al., Mol. Med. Today, 2000, 6: 66-71; Shedlock et al., J. Leukoc. Biol., 2000, 68: 793-806; Hipp et al., In vivo, 2000, 14: 571-85.

[0141] Доставка полинуклеотида в организм пациента может быть непосредственной, в случае чего пациенту непосредственно вводят несущий полинуклеотид вектор, или опосредованной, в случае чего клетки сначала трансформируют представляющим интерес полинуклеотидом *in vitro*, а затем клетки трансплантируют пациенту. Эти два подхода известны, соответственно, как генотерапия *in vivo* и *ex vivo*.

[0142] Для общего обзора способов генотерапии см. Goldspiel et al., Clinical Pharmacy, 1993, 12: 488-505; Wu and Wu, Biotherapy, 1991, 3: 87-95; Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 1993, 33: 573-96; Mulligan, Science, 1993, 260: 926-32; Morgan & Anderson, Ann. Rev. Biochem., 1993, 62: 191-217; Trends in Biotechnology, 1993, 11(5): 155-215). Способы, общеизвестные в области технологии рекомбинантных ДНК, которые применимы в настоящем изобретении, описаны в Ausubel et al. in Current Protocols in Molecular Biology, (John Wiley & Sons, NY, 1993) и Krieger in Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual (Stockton Press, NY, 1990).

[0143] Подобно введению пептидов, введение полинуклеотидов можно проводить посредством пероральной, интрадермальной, подкожной, внутривенной, внутримышечной, внутрикостной и/или перитонеальной инъекции или т.д. Введение может представлять собой системное введение или местное введение (т.е., прямую инъекцию) рядом с намеченными участками. Введение можно проводить посредством однократного введения или усиливать посредством нескольких введений. Индивидууму с необходимостью в лечении злокачественной опухоли или опухоли, экспрессирующей KNTC2, можно вводить фармацевтически или терапевтически эффективное количество полинуклеотида по настоящему изобретению. Альтернативно, индивидууму со злокачественной опухолью, экспрессирующей KNTC2, можно вводить количество полинуклеотида по настоящему изобретению, достаточное для индукции CTL против злокачественной опухоли или опухоли, экспрессирующей KNTC2. Дозу полинуклеотида в подходящем носителе или клетках, трансформированных полинуклеотидом, кодирующим пептиды по настоящему изобретению, можно регулировать соответствующим образом в зависимости от подлежащего лечению заболевания, возраста пациента, массы, способа введения и т.д., и, как правило, она составляет от 0,001 мг до 1000 мг, например, от 0,1 мг до 30 мг, например, от 0,01 мг до 100 мг, например, от 0,1 мг до 10 мг, например, от 0,5 мг до 5 мг, и ее можно вводить от одного раза каждые несколько суток до одного раза каждые несколько месяцев, например, раз в неделю. Специалист в данной области может легко определить подходящие и оптимальные дозы.

[0144] X. Способы применения пептидов, экзосом, APC и CTL:

Пептиды и полинуклеотиды по настоящему изобретению можно использовать для получения или индукции APC и CTL. Экзосомы и APC по настоящему изобретению также можно использовать для получения или индукции CTL. Пептиды, полинуклеотиды, экзосомы и APC можно использовать в комбинации с любыми другими соединениями при условии, что дополнительное соединения не ингибирует способность к индукции CTL. Таким образом, для получения или индукции CTL можно использовать любые из указанных выше фармацевтических композиций или средств по настоящему изобретению. Кроме того, такие соединения, включающие пептиды или полинуклеотиды, также можно использовать для получения или индукции APC, как описано ниже.

[0145] (1) Способы индукции антигенпрезентирующих клеток (APC)

Настоящее изобретение относится к способам индукции APC со способностью к

индукции CTL с использованием пептидов или полинуклеотидов по настоящему изобретению.

[0146] Способы по настоящему изобретению включают стадию приведения APC в контакт с пептидами по настоящему изобретению *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. Например, способ приведения APC в контакт с пептидом *ex vivo* может включать стадии:

а: получения APC у индивидуума, и

б: приведения APC после стадии "а" в контакт с пептидом по настоящему изобретению.

APC не ограничены конкретным типом клеток и включают DC, клетки Лангерганса, макрофаги, В-клетки и активированные Т-клетки, для которых известно, что они презентруют белковые антигены на своей клеточной поверхности, таким образом, чтобы их могли распознавать лимфоциты. Предпочтительно можно использовать DC, т.к. они обладают наибольшей способностью к индукции CTL среди APC. Любой из пептидов по настоящему изобретению можно использовать сам по себе или в комбинации с одним или несколькими из других пептидов по настоящему изобретению и/или с одним или несколькими индуцирующими CTL пептидами, получаемыми из ТАА, отличных от KNTC2.

[0147] С другой стороны, когда пептиды по настоящему изобретению вводят индивидууму, APC контактируют с пептидами *in vivo*, и, таким образом, в организме индивидуума происходит индукция APC со способностью к индукции CTL. Таким образом, способ по настоящему изобретению может включать стадию введения индивидууму пептида по настоящему изобретению с индукцией APC со способностью к индукции CTL в организме индивидуума. Подобным образом, когда индивидууму вводят полинуклеотид по настоящему изобретению в экспрессируемой форме, экспрессируется пептид и контактирует с APC *in vivo*, и, таким образом, в организме индивидуума индуцируется APC со способностью к индукции CTL. Таким образом, настоящее изобретение также может включать введение индивидууму полинуклеотида по настоящему изобретению с индукцией APC со способностью к индукции CTL в организме индивидуума. Фраза "экспрессируемая форма" описана выше в разделе "IX. Фармацевтические композиции (2) Фармацевтические композиции, содержащие полинуклеотиды".

[0148] Способ по настоящему изобретению может дополнительно включать стадию введения в APC полинуклеотида по настоящему изобретению с индукцией APC со способностью индукции CTL. Например, способ может включать стадии:

а: получения APC у индивидуума, и

б: введения в APC, полученные на стадии а, полинуклеотида, кодирующего пептид по настоящему изобретению.

[0149] Этап б можно проводить, как описано выше, в разделе "VI. Антигенпрезентирующие клетки (APC)".

Альтернативно, способы по настоящему изобретению могут включать стадию получения APC, которые могут специфически индуцировать активность CTL против KNTC2, посредством одного из следующих стадий:

(а) приведения APC в контакт с пептидом по настоящему изобретению *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*; и

(б) введения в APC полинуклеотида, кодирующего пептид по настоящему изобретению.

[0150] Альтернативно, способы по настоящему изобретению могут включать стадию индукции APC со способностью к индукции CTL посредством одного из следующих стадий:

(a) приведения APC в контакт с пептидом по настоящему изобретению; и
 (b) введения в APC полинуклеотида, кодирующего пептид по настоящему изобретению.

[0151] Способы по настоящему изобретению можно проводить *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. Предпочтительно, способы по настоящему изобретению можно проводить *in vitro* или *ex vivo*. APC, используемые для индукции APC со способностью к индукции CTL, предпочтительно могут представлять собой APC, экспрессирующие антиген HLA-A2 (т.е. положительные по HLA-A2 APC). Такие APC можно получать хорошо известными в данной области способами из моноклеарных клеток периферической крови (PBMC), получаемых у индивидуума антиген HLA которого представляет собой HLA-A2. APC, индуцируемые способом по настоящему изобретению, могут представлять собой APC, презентирующие на своей поверхности комплекс пептида по настоящему изобретению и HLA-антигена (антигена HLA-A2). Когда APC, индуцируемые способом по настоящему изобретению, вводят индивидууму для индукции у индивидуума иммунного ответа против злокачественной опухоли, индивидуум предпочтительно является тем же индивидуумом, у которого получали APC. Однако индивидуум может отличаться от донора APC при условии, что индивидуум является носителем того же типа HLA, что и тип HLA APC донора.

[0152] В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к средствам или композициям для применения для индукции APC со способностью к индукции CTL, и такие средства или композиции включают один или несколько пептидов или полинуклеотидов по настоящему изобретению.

[0153] В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению пептида по настоящему изобретению или полинуклеотида, кодирующего такой пептид, в производстве композиции, формулируемой для индукции APC.

[0154] Альтернативно, настоящее изобретение дополнительно относится к пептиду по настоящему изобретению или полипептиду, кодирующему пептид для применения в индукции APC со способностью к индукции CTL.

[0155] (2) Способ индукции CTL:

Настоящее изобретение также относится к способам индукции CTL с использованием пептидов, полинуклеотидов или экзосом или APC по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также относится к способам индукции CTL с использованием полинуклеотида, кодирующего обе субъединицы TCR, или полинуклеотидов, кодирующих каждую из субъединиц TCR, где TCR, формируемый такими субъединицами, может распознавать (т.е. связываться) комплекс пептида по настоящему изобретению и антигена HLA на клеточной поверхности. Предпочтительно, способы индукции CTL могут включать по меньшей мере одну стадию, выбранную из:

а: приведения CD8-положительной Т-клетки в контакт с антигенпрезентирующей клеткой, которая презентрует на своей поверхности комплекс HLA-антигена и пептида по настоящему изобретению;

б: приведения CD8-положительной Т-клетки в контакт с экзосомой, которая презентрует на своей поверхности комплекс HLA-антигена и пептида по настоящему изобретению, и

с: введения полинуклеотида, кодирующего обе субъединицы TCR, или полинуклеотидов, кодирующих каждую из субъединиц TCR, в CD8-положительную Т-клетку, где TCR, образованный такими субъединицами, может распознавать (связываться) комплекс пептида по настоящему изобретению и антигена HLA на клеточной поверхности.

[0156] Когда пептиды, полинуклеотиды, APC или экзосомы по настоящему изобретению вводят индивидууму, в организме индивидуума индуцируются CTL, и повышается эффективность иммунного ответа, направленного на злокачественные клетки, экспрессирующие KNTC2. Таким образом, способы по настоящему изобретению могут включать стадию введения индивидууму пептидов, полинуклеотидов, APC или экзосом по настоящему изобретению.

Альтернативно, CTL также можно индуцировать с использованием их *ex vivo* или *in vivo*, и после индукции CTL активированные CTL можно возвращать индивидууму. Например, способ может включать стадии:

a: получения APC у индивидуума,

b: приведения APC после стадии "a" в контакт с пептидом по настоящему изобретению,

и

c: совместного культивирования APC после стадии "b" с CD8-положительными Т-клетками.

[0157] APC для совместного культивирования с CD8-положительными Т-клетками на указанных выше стадиях, также можно получать посредством переноса полинуклеотида по настоящему изобретению в APC, как описано выше в разделе "VI. Антигенпрезентирующие клетки (APC)", хотя настоящее изобретение не ограничено этим и, таким образом, включает любые APC, которые эффективно презентуют на своей поверхности комплекс HLA-антигена и пептида по настоящему изобретению.

[0158] Необязательно, вместо указанных выше APC, можно использовать экзосомы, которые презентуют на своей поверхности комплекс HLA-антигена и пептида по настоящему изобретению. Таким образом, настоящее изобретение может включать стадию совместного культивирования экзосом, презентующих на своей поверхности комплекс HLA-антигена и пептида по настоящему изобретению, и CD8-положительных Т-клеток. Такие экзосомы можно получать способами, описанными выше в разделе "V. Экзосомы". Подходящие APC и экзосомы для способа по настоящему изобретению презентуют на своей поверхности комплекс пептида по настоящему изобретению и HLA-A2.

[0159] Кроме того, CTL можно индуцировать посредством введения в CD8-положительную Т-клетку полинуклеотида, кодирующего обе субъединицы TCR, или полинуклеотидов, кодирующих каждую из субъединиц TCR, где TCR, формируемый такими субъединицами, способен связываться с комплексом пептида по изобретению и HLA-антигена на клеточной поверхности. Таковую трансдукцию можно проводить, как описано выше в разделе "VIII. Т-клеточный рецептор (TCR)".

[0160] Способы по настоящему изобретению можно проводить *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. Предпочтительно способы по настоящему изобретению можно проводить *in vitro* или *ex vivo*. CD8-положительные Т-клетки, используемые для индукции CTL, можно получать хорошо известными в данной области способами из PBMC, получаемых у индивидуума. В предпочтительных вариантах осуществления донор CD8-положительных Т-клеток может представлять собой индивидуума, у которого HLA-антиген представляет собой HLA-A2. CTL, индуцируемые способом по настоящему изобретению, могут распознавать клетки, презентующие на своей поверхности комплекс пептида по настоящему изобретению и HLA-антигена (например, HLA-A2). Такие CTL могут проявлять специфическую цитотоксическую активность против клеток, которые презентуют на поверхности пептид по настоящему изобретению, и, таким образом, могут проявлять специфическую цитотоксическую активность против клеток, экспрессирующих KNTC2, (например, злокачественных клеток). Когда CTL,

индуцируемые способом по настоящему изобретению, вводят индивидууму для индукции иммунного ответа против злокачественной опухоли у индивидуума, индивидуум предпочтительно является тем же индивидуумом, у которого получали CD8-положительные Т-клетки. Однако индивидуум может отличаться от донора CD8-положительных Т-клеток при условии, что индивидуум является носителем того же типа HLA, что и донор CD8-положительных Т-клеток.

[0161] Кроме того, настоящее изобретение относится к способу или процессу производства фармацевтической композиции для применения для индукции CTL, где способ или процесс включают стадию смешивания или формулирования пептида по настоящему изобретению с фармацевтически приемлемым носителем.

[0162] В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции для индукции CTL, где средство или композиция содержат один или несколько пептидов, один или несколько полинуклеотидов, одну или несколько APC и/или одну или несколько экзосом по настоящему изобретению.

[0163] В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению пептида, полинуклеотида, APC или экзосомы по настоящему изобретению в производстве композиции, формулируемой для индукции CTL. Альтернативно, настоящее изобретение дополнительно относится к пептиду, полинуклеотиду, APC или экзосоме по настоящему изобретению для применения в индукции CTL.

[0164] XI. Способы индукции иммунного ответа:

Кроме того, настоящее изобретение относится к способам индукции иммунного ответа против заболеваний, связанных с KNTC2. Подходящие заболевания включают злокачественную опухоль, примеры которой включают, но не ограничиваются ими, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, холангиокарциному, хронический миелолейкоз (CML), колоректальный рак, рак пищевода, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), лимфому, остеосаркому, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечно-клеточный рак, мелкоклеточный рак легких (SCLC) и опухоль мягких тканей. Предпочтительно, злокачественная опухоль экспрессирует HLA-A2 (т.е. является положительной по HLA-A2 злокачественной опухолью).

[0165] Способы по настоящему изобретению могут включать стадию введения средства или композиции, содержащих любые пептиды по настоящему изобретению или полинуклеотиды, кодирующие их. Способы по изобретению также предусматривают введение экзосом или APC, презентующих любые пептиды по настоящему изобретению. Для более подробного описания см. раздел "IX. Фармацевтические композиции", в частности часть, описывающую применение фармацевтических композиций по настоящему изобретению в качестве вакцин. Кроме того, экзосомы и APC, которые можно применять в способах по настоящему изобретению для индукции иммунного ответа, подробно описаны выше в разделах "V. Экзосомы", "VI.

Антигенпрезентирующие клетки (APC)" и (1) и (2) из "X. Способы применения пептидов, экзосом, APC и CTL".

[0166] Настоящее изобретение также относится к способу или процессу для получения фармацевтической композиции или средства для применения индукции иммунного ответа против злокачественной опухоли, где способ или процесс могут включать стадию смешивания или формулирования пептида по настоящему изобретению с фармацевтически приемлемым носителем.

[0167] Альтернативно, способ по настоящему изобретению может включать стадию введения вакцины, или фармацевтической композиции, или средства по настоящему

изобретению, которое содержит:

(a) пептид по настоящему изобретению;

(b) полинуклеотид, кодирующий такой пептид по изобретению в экспрессируемой форме;

5 (c) APC, презентирующую на своей поверхности пептид по настоящему изобретению;

(d) экзосому, презентирующую на своей поверхности пептид по настоящему изобретению; или

(e) CTL по настоящему изобретению.

[0168] В контексте настоящего изобретения злокачественную опухоль, 10 сверхэкспрессирующую KNTC2, можно лечить этими активными ингредиентами. Примеры такой злокачественной опухоли включают, но не ограничиваются ими, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, холангиокарциному, хронический миелолейкоз (CML), колоректальный рак, рак пищевода, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), лимфому, остеосаркому, рак яичника, рак поджелудочной железы, 15 рак предстательной железы, почечно-клеточный рак, мелкоклеточный рак легких (SCLC) и опухоль мягких тканей.

[0169] Таким образом, перед введением вакцин или фармацевтических композиций или средств, содержащих указанные выше активные ингредиенты, предпочтительно 20 подтверждать, является ли уровень экспрессии KNTC2 в злокачественных клетках или тканях, получаемых у индивидуума, подлежащего лечению, повышенным по сравнению с нормальными клетками или тканями, получаемыми у того же индивидуума. Таким образом, в одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли, (сверх)экспрессирующей KNTC2, у 30 нуждающегося в этом пациента, где такой способ включает стадии:

25 i) определения уровня экспрессии KNTC2 в биологическом образце, получаемом у подлежащего лечению индивидуума со злокачественной опухолью;

ii) сравнения уровня экспрессии KNTC2 с нормальным контролем, и

iii) введения по меньшей мере одного компонента, выбранного из описанных выше (a)-(e), индивидууму со злокачественной опухолью, сверхэкспрессирующей KNTC2 по 30 сравнению с нормальным контролем.

[0170] Альтернативно, настоящее изобретение относится к вакцине или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере один компонент, выбранный из описанных выше (a)-(e), для введения индивидууму со злокачественной опухолью, сверхэкспрессирующей KNTC2. Другими словами, настоящее изобретение 35 дополнительно относится к способу идентификации индивидуума для лечения пептидом по настоящему изобретению, где такой способ включает стадию определения уровня экспрессии KNTC2 в получаемом у индивидуума биологическом образце, где повышение уровня экспрессии по сравнению с нормальным контрольным уровнем KNTC2 свидетельствует о том, что индивидуум может страдать злокачественной опухолью, 40 которую можно лечить пептидом по настоящему изобретению.

[0171] Кроме того, в предпочтительных вариантах осуществления тип HLA индивидуума можно идентифицировать перед введением пептидов по настоящему изобретению. Для введения вакцины или фармацевтической композиции по настоящему изобретению предпочтительно можно отбирать положительных по HLA-A2 45 индивидуумов.

[0172] Для определения уровня экспрессии KNTC2 можно использовать любую получаемую у индивидуума клетку или ткань при условии, что они могут содержать продукт транскрипции или трансляции KNTC2. Примеры подходящих образцов

включают, но не ограничиваются ими, ткани и жидкости организма, такие как кровь, мокрота и моча. Предпочтительно получаемый у индивидуума образец клетки или ткани содержит популяцию клеток, содержащих эпителиальные клетки, более предпочтительно злокачественные эпителиальные клетки или эпителиальные клетки, получаемые из злокачественной ткани. Кроме того, при необходимости клетку можно выделять из получаемых тканей и жидкостях организма, а затем использовать в качестве образца, получаемого у индивидуума.

[0173] По настоящему изобретению уровень экспрессии KNTC2 можно определять в биологическом образце, получаемом у индивидуума. Уровень экспрессии KNTC2 можно определять на уровне транскрипции продукта (нуклеиновой кислоты) известными в данной области способами. Например, мРНК KNTC2 можно количественно определять способами гибридизации с использованием зондов (например, посредством нозерн-гибридизации). Детекцию можно проводить на чипе или микропанели. Для детекции уровня экспрессии KNTC2 использование микропанели является предпочтительным. Специалисты в данной области могут получать такие зонды с использованием информации о последовательности KNTC2. Например, в качестве зондов можно использовать кДНК KNTC2. При необходимости зонд можно метить подходящей меткой, такой как красители, флуоресцентные вещества и изотопы, и уровень экспрессии KNTC2 можно детектировать как интенсивность гибридизующихся меток.

[0174] Кроме того, продукт транскрипции KNTC2 можно количественно определять с использованием праймеров способами детекции на основе амплификации (например, ОТ-ПЦР). Такие праймеры можно получать на основе доступной информации о последовательности KNTC2.

[0175] В частности, зонд или праймер, используемый для способа по настоящему изобретению, гибридизуют с мРНК KNTC2 в жестких, умеренно жестких условиях или условиях с низкой жесткостью. Как используют в настоящем документе, фраза "жесткие условия (гибридизации)" относится к условиям, при которых зонд или праймер гибридизуется со своей последовательностью-мишенью, но не с другими последовательностями. Жесткости условия зависят от последовательности и являются различными при различных обстоятельствах. Специфическую гибридизацию более длинных последовательностей наблюдают при более высоких температурах по сравнению с более короткими последовательностями. Как правило, температуру жестких условий выбирают так, чтобы она являлась приблизительно на 5 градусов Цельсия ниже температуры теплового плавления (T_m) для конкретной последовательности при определенной ионной силе и pH. T_m представляет собой температуру (при определенной ионной силе, pH и концентрации нуклеиновой кислоты), при которой 50% зондов, комплементарных их последовательности-мишени, гибридизуются с последовательностью-мишенью в равновесном состоянии. Вследствие того, что последовательности-мишени при T_m , как правило, содержатся в избытке, при равновесном состоянии занято 50% зондов. Как правило, жесткие условия представляют собой условия, при которых концентрация солей составляет приблизительно менее 1,0 М иона натрия, как правило, приблизительно от 0,01 до 1,0 М иона натрия (или других солей) при pH от 7,0 до 8,3, и температура составляет по меньшей мере приблизительно 30 градусов Цельсия для коротких зондов или праймеров (например, от 10 до 50 нуклеотидов) и по меньшей мере приблизительно 60 градусов Цельсия для более длинных зондов или праймеров. Жесткие условия также можно получать при добавлении дестабилизирующих веществ, таких как формамид.

[0176] Зонд или праймер по настоящему изобретению, как правило, представляет собой в значительной степени очищенный олигонуклеотид. Олигонуклеотид, как правило, содержит область последовательности нуклеотидов, которая гибридизуется в жестких условиях с непрерывной последовательностью нуклеотидов смысловой цепи нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность KNTC2, или с последовательностью нуклеотидов антисмысловой цепи нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность KNTC2, длиной по меньшей мере приблизительно 2000, 1000, 500, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50 или 25 нуклеотидов, или природным мутантом таких последовательностей. В частности, например, в предпочтительном варианте осуществления в качестве праймера для амплификации генов, которые необходимо детектировать, можно использовать олигонуклеотид длиной 5-50 нуклеотидов. Более предпочтительно мРНК или кДНК гена KNTC2 можно детектировать с использованием олигонуклеотидного зонда или праймера конкретного размера, как правило, длиной 15-30 пар оснований. Размер может находиться в диапазоне по меньшей мере 10 нуклеотидов, по меньшей мере 12 нуклеотидов, по меньшей мере 15 нуклеотидов, по меньшей мере 20 нуклеотидов, по меньшей мере 25 нуклеотидов, по меньшей мере 30 нуклеотидов, и размер зондов и праймеров может находиться в диапазоне 5-10 нуклеотидов, 10-15 нуклеотидов, 15-20 нуклеотидов, 20-25 нуклеотидов и 25-30 нуклеотидов. В предпочтительных вариантах осуществления длину олигонуклеотидного зонда или праймера можно выбирать из 15-25 нуклеотидов. Способы анализа, устройства или реагенты для детекции гена с использованием такого олигонуклеотидного зонда или праймера хорошо известны (например, микропанель олигонуклеотидов или ПЦР). В этих анализах зонды или праймеры также могут включать метку или линкерные последовательности. Кроме того, зонды или праймеры можно модифицировать детектируемой меткой или аффинным лигандом для захватывания. Альтернативно, в способах детекции на основе гибридизации для зонда также можно использовать полинуклеотид длиной от нескольких сотен (например, приблизительно 100-200) оснований до нескольких тысяч (например, приблизительно 1000-2000) оснований (например, для анализа "нозерн"-блоттингом или анализа на основе кДНК-микропанели).

[0177] Альтернативно, продукт трансляции KNTC2 можно детектировать для идентификации индивидуума, подлежащего лечению способом по настоящему изобретению. Например, можно определять количество белка KNTC2 (SEQ ID NO: 79). Примеры способов определения количества белка KNTC2 в качестве продукта трансляции включают, но не ограничиваются ими, способы иммунологического анализа с использованием антитела, специфически распознающего белок KNTC2. Антитело может быть моноклональным или поликлональным. Кроме того, для детекции можно использовать любой фрагмент или модификацию (например, химерное антитело, scFv, Fab, F(ab')₂, Fv и т.д.) антитела при условии, что фрагмент или модифицированное антитело сохраняет способность связываться с белком KNTC2. Способы получения таких типов антител хорошо известны в данной области, и для получения таких антител и их эквивалентов можно использовать любой способ.

[0178] В качестве другого способа детекции уровня экспрессии KNTC2 на основе продукта его трансляции, можно измерять интенсивность окрашивания посредством иммуногистохимического анализа с использованием антитела к белку KNTC2. А именно, интенсивное окрашивание в этом измерении указывает на повышенное содержание/уровень белка KNTC2 и одновременно на высокий уровень экспрессии KNTC2.

[0179] Можно определять, что уровень экспрессии гена KNTC2 в полученном у

индивидуума образце повышен, если уровень по сравнению с контрольным уровнем (например, уровня в нормальных клетках) KNTC2 повышается, например, на 10%, 25% или 50%, или повышается более чем в 1,1 раза, более чем в 1,5 раза, более чем в 2,0 раза, более чем в 5,0 раз, более чем в 10,0 раз или более.

5 [0180] Контрольный уровень можно определять одновременно с уровнем в злокачественных клетках с использованием предварительно полученного у здорового индивидуума/индивидуумов и хранящегося образца(ов). Кроме того, в качестве нормального контроля можно использовать нормальные клетки, получаемые из незлокачественных областей органа, который содержит злокачественную опухоль, подлежащую лечению. Альтернативно, контрольный уровень можно определять
10 статистическим способом на основе результатов, получаемых посредством анализа предварительно определяемого уровня(ей) экспрессии KNTC2 в образцах у индивидуумов, у которых известно состояние болезни. Кроме того, контрольный уровень можно получать из базы данных профилей экспрессии ранее тестированных
15 клеток. Кроме того, по одному из аспектов настоящего изобретения уровень экспрессии KNTC2 в биологическом образце можно сравнивать с несколькими контрольными уровнями, которые определяют в нескольких эталонных образцах. Предпочтительно использовать контрольный уровень, определяемый в эталонном образце, получаемом из типа ткани, сходного с типом ткани полученного у индивидуума биологического
20 образца. Кроме того, предпочтительно использовать стандартное значение уровней экспрессии гена KNTC2 в популяции с известным состоянием болезни. Стандартное значение можно получать любым известным в данной области способом. Например, в качестве стандартного значения можно использовать диапазон среднее ± 2 станд. откл. или среднее ± 3 станд. откл.

25 [0181] В контексте настоящего изобретения контрольный уровень, определяемый в биологическом образце, для которого известно, что он не является злокачественным, обозначают как "нормальный контрольный уровень". С другой стороны, если контрольный уровень определяют в злокачественном биологическом образце, его обозначают как "злокачественный контрольный уровень".

30 [0182] Разницу между уровнем экспрессии образца и контрольным уровнем можно нормализовать на уровень экспрессии контрольной нуклеиновой кислоты, например, генов "домашнего хозяйства", для которых известно, что их уровни экспрессии не отличаются в зависимости от злокачественного или незлокачественного состояния клетки. Иллюстративные контрольные гены включают, но не ограничиваются ими,
35 бета-актин, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу и рибосомный белок P1.

[0183] Когда уровень экспрессии KNTC2 по сравнению с нормальным контрольным уровнем повышается, индивидуума можно идентифицировать как индивидуума со злокачественной опухолью, подлежащего лечению посредством введения фармацевтической композиции или средства по настоящему изобретению.

40 [0184] Настоящее изобретение также относится к способу отбора индивидуума для лечения злокачественных опухолей с использованием указанных выше фармацевтических композиций или средств по настоящему изобретению, где такой способ включает стадии:

- а) определения уровня экспрессии KNTC2 в биологическом образце(ах), полученных у индивидуума со злокачественной опухолью;
- 45 б) сравнения уровня экспрессии KNTC2, определенного на стадии а), с нормальным контрольным уровнем; и
- с) отбора индивидуума для лечения злокачественных опухолей посредством фармацевтических композиций или средств по настоящему изобретению, если уровень

экспрессии KNTC2 повышен по сравнению с нормальным контрольным уровнем.

[0185] В определенных вариантах осуществления такой способ после или перед стадиями а)-с), определенными выше, может дополнительно включать стадию идентификации индивидуума, несущего HLA-A2 (т.е. положительного по HLA-A2 индивидуума). Способы типирования HLA хорошо известны в данной области. Например, можно использовать способы типирования аллелей HLA на основе ПЦР. Также подходящими способами для идентификации HLA индивидуума являются антитела к HLA-A2.

[0186] В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение дополнительно относится к диагностическому набору, содержащему один или несколько пептидов по настоящему изобретению.

[0187] Злокачественную опухоль можно диагностировать посредством детекции антител к одному или нескольким пептидам по настоящему изобретению в полученном у индивидуума образце (например, крови, ткани) с использованием пептида по настоящему изобретению.

[0188] Индивидуума полагают страдающим злокачественной опухолью, если полученный у индивидуума образец (например, образец крови) содержит антитела к пептиду по настоящему изобретению, и определяют, что количество антител составляет более порогового значения по сравнению с контрольным уровнем.

[0189] В другом варианте осуществления диагностический набор по настоящему изобретению может содержать пептид по настоящему изобретению и молекулу HLA, связывающуюся с ним. Способ детекции антигенспецифических CTL с использованием антигенных пептидов и молекул HLA уже разработан (например, Altman J.D. et al., Science, 1996, 274(5284): 94-6). Таким образом, в способе для детекции CTL, специфических к опухолевым антигенам, можно применять комплекс пептида по настоящему изобретению и молекулы HLA, таким образом, обеспечивая раннюю детекцию рецидива и/или метастазирования злокачественной опухоли. Кроме того, его можно применять для отбора индивидуумов, для которых можно применять фармацевтические композиции, содержащие в качестве активного ингредиента пептид по настоящему изобретению, или оценки эффекта лечения фармацевтическими композициями.

[0190] В частности, известным способом (см., например, Altman J.D. et al., Science, 1996, 274(5284): 94-6) можно получать олигомерный комплекс, такой как тетрамер, радиоактивно меченой молекулы HLA и пептида по настоящему изобретению. С использованием комплекса можно проводить диагностику, например, посредством количественного определения специфических к пептиду-антигену CTL в лимфоцитах периферической крови, получаемых у индивидуума, у которого подозревают наличие злокачественной опухоли.

[0191] Настоящее изобретение дополнительно относится к диагностическим средствам и способам оценки иммунного ответа индивидуума посредством использования пептида по настоящему изобретению. В одном из вариантов осуществления изобретения пептиды по настоящему изобретению используют в качестве реагентов для оценки или прогнозирования иммунного ответа индивидуума. Подлежащий оценке иммунный ответ индуцируют путем приведения иммуногена (т.е. пептида по настоящему изобретению) в контакт с иммунокомпетентными клетками *in vitro* или *in vivo*. В предпочтительных вариантах осуществления иммунокомпетентные клетки для оценки иммунного ответа можно выбирать из клеток периферической крови, лимфоцитов периферической крови (PBL) и мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC).

Способы сбора или выделения таких иммунокомпетентных клеток хорошо известны в данной области. В определенных вариантах осуществления в качестве реагента можно использовать любое средство, которое может приводить к получению специфичных к антигенам CTL, которые распознают и связывают пептид-эпитоп(ы). Пептидный реагент не обязательно нужно использовать в качестве иммуногена. Системы анализа, которые используют для такого анализа, включают относительно недавние технические открытия, такие как анализы окрашивания тетрамеров, анализы окрашивания на внутриклеточные лимфокины и анализы высвобождения интерферона, или анализы ELISPOT. В предпочтительном варианте осуществления иммунокомпетентные клетки, которые необходимо приводить в контакт с пептидным реагентом, могут представлять собой антигенпрезентирующие клетки, включая дендритные клетки.

[0192] Например, пептиды по настоящему изобретению можно использовать в анализах окрашивания тетрамеров для оценки моноклеарных клеток периферической крови на наличие антигенспецифических CTL после экспозиции антигена или иммуногена опухолевых клеток. Тетрамерный комплекс HLA можно использовать для непосредственной визуализации антигенспецифических CTL (см., например, Ogg et al., Science, 279: 2103-2106, 1998; и Altman et al., Science, 174: 94-96, 1996) и определения частоты популяции антигенспецифических CTL в образце моноклеарных клеток периферической крови. Тетрамерный реагент, в котором используют пептид по изобретению, можно получать, как описано ниже.

[0193] Пептид, который связывается с молекулой HLA, в присутствии соответствующей тяжелой цепи HLA и бета-2-микроглобулина подвергается рефолдингу с образованием термостойкого комплекса. В комплексе карбоксильный конец тяжелой цепи биотинилирован на участке, который предварительно встраивали в белок. Затем к комплексу добавляют стрептавидин с образованием тетрамера, состоящего из термостойкого комплекса и стрептавида. Посредством флуоресцентно меченого стрептавида тетрамер можно использовать для окрашивания антигенспецифических клеток. Затем можно идентифицировать клетки, например, посредством проточной цитометрии. Такой анализ можно использовать для диагностических или прогностических целей. Идентифицированные таким способом клетки также можно использовать для терапевтических целей.

[0194] Пептиды по настоящему изобретению также можно использовать для получения антител хорошо известными в данной области способами (см., например, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY, и Antibodies A Laboratory Manual, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), которые могут являться пригодными в качестве реагентов для диагностики или мониторинга злокачественной опухоли. Такие антитела могут включать антитела, которые распознают пептид в сочетании с молекулой HLA, т.е. антитела, которые связываются с комплексом пептид-МНС.

[0195] Пептиды и композиции по настоящему изобретению имеют ряд дополнительных применений, некоторые из которых описаны в настоящем документе. Например, настоящее изобретение относится к способу диагностики или детекции нарушения, характеризующегося экспрессией полипептида KNTC2.

[0196] Например, диагностику можно проводить способом, который обеспечивает прямое количественное определение антигенспецифических Т-клеток посредством окрашивания меченных флуоресцеином мультимерных комплексов HLA (например, Altman J.D. et al., 1996, Science, 274: 94; Altman J.D. et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 10330). Также можно использовать окрашивание на внутриклеточные лимфокины

и анализы высвобождения интерферона-гамма или анализы ELISPOT. Показано, что окрашивание тетрамерами, окрашивание внутриклеточных лимфокинов и анализы ELISPOT являются по меньшей мере в 10 раз более чувствительными, чем общепринятые анализы (Murali-Krishna K. et al., 1998, Immunity, 8: 177; Lalvani A. et al., 1997, J. Exp. Med., 186: 859; Dunbar P.R. et al., 1998, Curr. Biol., 8: 413). Также можно использовать пентамеры (например, US 2004-209295A), декстрамеры (например, WO 02/072631) и стрептамеры (например, Nature medicine, 6, 631-637 (2002)).

[0197] Например, в определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу диагностики или оценки иммунного ответа индивидуума, которому вводили по меньшей мере один из пептидов KNTC2 по настоящему изобретению, где способ включает стадии:

(а) приведения иммуногена в контакт с иммунокомпетентными клетками в условиях, подходящих для индукции CTL, специфического к иммуногену;

(b) детекции или определения уровня индукции CTL, индуцируемых на стадии (а), и

(с) проведение корреляции иммунного ответа индивидуума с уровнем индукции CTL.

[0198] В контексте настоящего изобретения, иммуноген предпочтительно включает по меньшей мере один из (а) пептидов KNTC2, содержащих последовательности аминокислот SEQ ID NO: 2, 3, 7, 17, 41, 53 или 68, и пептидов, в которых такие последовательности аминокислот модифицировали 1, 2 или несколькими заменами аминокислот. В то же время условия, подходящие для индукции иммуногенных специфических CTL, хорошо известны в данной области. Например, иммунокомпетентные клетки можно культивировать *in vitro* в присутствии иммуногена (ов) для индукции специфических к иммуногену CTL. Для индукции специфических к иммуногену CTL к культуре клеток можно добавлять любые стимулирующие факторы. Например, для индукции CTL предпочтительным стимулирующим фактором является IL-2.

[0199] В определенных вариантах осуществления стадию мониторинга или оценки иммунного ответа индивидуума, подлежащего лечению с использованием пептидной терапии злокачественной опухоли, можно проводить до, во время и/или после лечения. Как правило, в течение протокола терапии злокачественной опухоли иммуногенные пептиды повторно вводят индивидууму, подлежащему лечению. Например, иммуногенные пептиды можно вводить каждую неделю в течение 3-10 недель. Таким образом, иммунный ответ индивидуума можно оценивать или мониторировать в течение протокола терапии злокачественной опухоли. Альтернативно, стадию оценки или мониторинга иммунного ответа на терапию злокачественной опухоли можно проводить по окончании протокола терапии.

[0200] По настоящему изобретению увеличенная индукция специфических к иммуногену CTL по сравнению с контролем свидетельствует о том, что оцениваемый или диагностируемый индивидуум, иммунологически отвечал на вводимый иммуноген (ы). Подходящие контроли для оценки иммунного ответа могут включать, например, уровень индукции CTL, когда иммунокомпетентные клетки не приводят в контакт с пептидом, или приводят в контакт с контрольным пептидом(ами) с последовательностями аминокислот, отличными от любых пептидов KNTC2 (например, со случайной последовательностью аминокислот).

[0201] XII. Антитела:

Настоящее изобретение дополнительно относится к антителам, которые связываются с пептидами по настоящему изобретению. Предпочтительные антитела специфически связываются с пептидами по настоящему изобретению и не связываются (или слабо

связываются) с другими пептидами. Антитела к пептидам по настоящему изобретению могут находить применение в диагностических и прогностических анализах злокачественных опухолей. Подобным образом, такие антитела могут находить применение при лечении, диагностике и/или прогнозе злокачественных опухолей. Кроме того, терапевтическое применение при лечении злокачественных опухолей, в которых вовлечена сверхэкспрессия KNTC2, примеры которых включают, но не ограничиваются ими, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, холангиокарциному, CML, колоректальный рак, рак пищевода, рак желудка, рак желудка диффузного типа, NSCLC, лимфому, остеосаркому, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, SCLC, опухоль мягких тканей и опухоль семенников, могут находить внутриклеточно экспрессируемые антитела (например, одноцепочечные антитела).

[0202] Настоящее изобретение также относится к различным иммунологическим анализам для детекции и/или количественного определения белка KNTC2 (SEQ ID NO: 79) или его фрагментов, включая пептиды с последовательностями аминокислот, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3, 7, 17, 41, 53 и 68. В контексте настоящего изобретения антитела к KNTC2, связывающиеся с полипептидом KNTC2, предпочтительно распознают полипептиды с последовательностями аминокислот, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3, 7, 17, 41, 53 и 68. Специфичность связывания антитела можно подтверждать тестом ингибирования. То есть, когда связывание анализируемого антитела и полноразмерного полипептида KNTC2 ингибируется в присутствии любого фрагмента с последовательностями аминокислот SEQ ID NO: 2, 3, 7, 17, 41, 53 и 68, полагают, что такое антитело специфически связывается с фрагментом. В контексте настоящего изобретения такие иммунологические анализы проводят в различных форматах иммунологического анализа, известных в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, различные типы радиоиммунологического анализа, иммунохроматографический способ, твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA), твердофазные иммунофлуоресцентные анализы (ELIFA) и т.п.

[0203] Родственные иммунологические, но не основанные на антителах анализы, могут включать анализы иммуногенности Т-клеток (ингибирования или стимуляции), а также анализы связывания МНС. Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрены способы иммунологической визуализации, которыми можно детектировать злокачественные опухоли, экспрессирующие KNTC2, примеры которых включают, но не ограничиваются ими, способы радиосцинтиграфической визуализации с использованием меченых антител по настоящему изобретению. Такие анализы находят клиническое применение при детекции, мониторинге и прогнозе экспрессирующих KNTC2 злокачественных опухолей, примеры которых включают, но не ограничиваются ими, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, холангиокарциному, хронический миелолейкоз (CML), колоректальный рак, рак пищевода, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), лимфому, остеосаркому, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечно-клеточный рак, мелкоклеточный рак легких (SCLC) и опухоль мягких тканей.

[0204] Антитело по настоящему изобретению можно использовать в любой форме, например, в виде моноклонального или поликлонального антитела, и оно может дополнительно включать антисыворотку, получаемую посредством иммунизации животного, такого как кролик, пептидом по настоящему изобретению, все классы поликлональных и моноклональных антител, антитела человека и гуманизированные антитела, получаемые посредством генетической рекомбинации.

[0205] Антитело по настоящему изобретению может распознавать пептиды KNTC2 с последовательностью аминокислот, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3, 7, 17, 41, 53 и 68. Способы синтеза олигопептида хорошо известны в данной области. После синтеза пептиды перед использованием в качестве иммуногена можно

5 необязательно очищать. В контексте настоящего изобретения олигопептид (например, 9- или 10-мер) можно конъюгировать или связывать с носителями для повышения иммуногенности. В качестве носителя хорошо известным является гемоцианин фиссуреллы (KLH). Способ конъюгации KLH и пептида также хорошо известен в данной области.

10 [0206] Альтернативно, ген, кодирующий пептид по настоящему изобретению или его фрагмент, можно встраивать в известный экспрессирующий вектор, который затем используют для трансформации клетки-хозяина, как описано в настоящем документе. Его желаемый пептид можно выделять из внешней или внутренней среды клеток-хозяев любым стандартным способом, а затем можно использовать в качестве антигена.

15 Альтернативно, в качестве антигена можно использовать цельные клетки, экспрессирующие пептид, или их лизаты и химически синтезированный пептид.

[0207] Антигеном можно иммунизировать любое млекопитающее животное, хотя предпочтительно учитывать совместимость с исходными клетками, используемыми для слияния клеток. Как правило, можно использовать животных семейства Rodentia,

20 Lagomorpha или Primate. Животные семейства Rodentia включают, например, мышь, крысу и хомяка. Животные семейства Lagomorpha включают, например, кролика. Животные семейства Primate включают, например, обезьяну Catarrhini (обезьяна Старого Света), такую как Macaca fascicularis, макака-резус, гамадрил и шимпанзе.

[0208] Способы иммунизации животных антигенами известны в данной области.

25 Стандартным способом иммунизации млекопитающих является интраперитонеальная инъекция или подкожная инъекция антигенов. Более конкретно, антигены можно разбавлять и суспендированы в подходящем количестве фосфатно-солевого буфера (PBS), физиологического раствора и т.д. При необходимости суспензию антигена можно смешивать с подходящим количеством стандартного адъюванта, такого как полный

30 адъювант Фрейнда, составлять в виде эмульсии, а затем вводить млекопитающим животным. Предпочтительно его сопровождают несколькими введениями антигена, смешанного с подходящим количеством неполного адъюванта Фрейнда каждые 4-21 суток. Для иммунизации также можно использовать подходящий носитель. После иммунизации, как описано выше, можно анализировать сыворотку стандартным

35 способом на увеличение количества желаемых антител.

[0209] Поликлональные антитела против пептидов по настоящему изобретению можно получать посредством сбора крови у иммунизированного млекопитающего, у которого анализируют повышение уровня желаемых антител в сыворотке, и выделения сыворотки из крови любым общепринятым способом. Поликлональные антитела могут

40 включать сыворотку, содержащую поликлональные антитела, а также из сыворотки можно выделять фракцию, содержащую поликлональные антитела. Иммуноглобулин G или M можно получать из фракции, которая распознает только пептид по настоящему изобретению, например, с использованием аффинной колонки, связанной с пептидом по настоящему изобретению, и дополнительно очищая такую фракцию с использованием

45 колонки с белком A или белком G.

[0210] Для получения моноклональных антител для применения в контексте настоящего изобретения иммунные клетки собирают у млекопитающего, иммунизированного антигеном, и исследуют на повышенный уровень желаемого

антитела в сыворотке, как описано выше, и подвергают слиянию клеток. Иммунные клетки, используемые для слияния клеток, предпочтительно можно получать из селезенки. Другие предпочтительные исходные клетки для слияния с указанным выше иммуноцитом, включают например, миеломные клетки млекопитающих, а более

5 предпочтительно - миеломные клетки, обладающие приобретенным свойством для отбора слитых клеток посредством лекарственных средств.

[0211] Указанные выше иммуноциты и миеломные клетки можно подвергать слиянию известными способами, например, способом Milstein et al. (Galfre and Milstein, Methods Enzymol 73: 3-46 (1981)).

10 [0212] Гибридомы, получаемые слиянием клеток, можно отбирать посредством их культивирования в стандартной селективной среде, такой как среда НАТ (среда, содержащая гипоксантин, аминоптерин и тимидин). Культуру клеток, как правило, поддерживают в среде НАТ в течение периода от нескольких суток до нескольких недель, где период времени является достаточным для обеспечения гибели всех других

15 клеток (неслитых клеток) за исключением желаемой гибридомы. Затем можно проводить стандартное лимитирующее разведение для скрининга и клонирования гибридных клеток, продуцирующих желаемые антитела.

[0213] В дополнение к указанному выше способу, где не являющееся человеком животное иммунизируют антигеном для получения гибридомы, пептидом,

20 экспрессирующими пептид клетками или их лизатами *in vitro* можно иммунизировать лимфоциты человека, такие как лимфоциты, инфицированные вирусом EB. Затем иммунизированные лимфоциты подвергают слиянию с получаемыми у человека миеломными клетками, которые способны к неограниченному делению, такими как U266, с получением гибридомы, продуцирующей желаемое антитело человека, которое

25 способно связываться с пептидом (нерассмотренная опубликованная патентная заявка Японии JPS 63-17688).

[0214] Затем полученные гибридомы можно трансплантировать в брюшную полость мыши и отобрать асцит. Полученные моноклональные антитела можно очищать, например, посредством осаждения сульфатом аммония, на колонке с белком А или

30 белком G, ионообменной хроматографии DEAE или на аффинной колонке, с которой связан пептид по настоящему изобретению. Антитело по настоящему изобретению можно использовать не только для очистки и детекции пептида по настоящему изобретению, но также и в качестве кандидата в агонисты и антагонисты пептида по настоящему изобретению.

35 [0215] Получаемые таким образом моноклональные антитела также можно получать рекомбинантно способами генетической инженерии (см., например, Borrebaeck and Larrick, Therapeutic Monoclonal Antibodies, опубликованную в the United Kingdom by MacMillan Publishers LTD (1990)). Например, ДНК, кодирующую антитело, можно клонировать из иммунной клетки, такой как гибридома или иммунизированный

40 лимфоцит, продуцирующий антитело, встраивать в подходящий вектор и вводить в клетки-хозяева для получения рекомбинантного антитела. Настоящее изобретение также относится к рекомбинантным антителам, получаемым, как описано выше.

[0216] Антитело по настоящему изобретению может представлять собой фрагмент антитела или модифицированное антитело при условии, что оно связывается с пептидом

45 по изобретению. Например, фрагмент антитела может представлять собой Fab, F(ab')₂, Fv или одноцепочечный Fv (scFv), в котором фрагменты Fv Н и L цепей лигированы подходящим линкером (Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5879-83 (1988)). Более конкретно, фрагмент антитела можно получать посредством обработки антитела таким

ферментом, как папаин или пепсин. Альтернативно, можно конструировать ген, кодирующий фрагмент антитела, встраивать в экспрессирующий вектор и экспрессировать в подходящей клетке-хозяине (см., например, Co et al., *J. Immunol.*, 152: 2968-76 (1994); Better and Horwitz, *Methods Enzymol.*, 178: 476-96 (1989); Pluckthun and Skerra, *Methods Enzymol.*, 178: 497-515 (1989); Lamoyi, *Methods Enzymol.*, 121: 652-63 (1986); Rousseaux et al., *Methods Enzymol.*, 121: 663-9 (1986); Bird and Walker, *Trends Biotechnol.*, 9: 132-7 (1991)).

[0217] Антитело можно модифицировать посредством конъюгации с рядом молекул, таких как полиэтиленгликоль (PEG). Настоящее изобретение относится к таким модифицированным антителам. Модифицированное антитело можно получать посредством химической модификации антитела. Такие способы модификации являются общепринятыми в данной области.

[0218] Альтернативно, антитело по настоящему изобретению можно получать в виде химерного антитела, между вариабельной областью, получаемой из не принадлежащего человеку антитела, и константной областью, получаемой из антитела человека, или в виде гуманизированного антитела, содержащего определяющую комплементарность область (CDR), получаемую из не принадлежащего человеку антитела, каркасную область (FR) и константную область, получаемые из антитела человека. Такие антитела можно получать известным способом. Гуманизацию можно проводить посредством замены CDR грызуна или последовательностей CDR соответствующих последовательностей антитела человека (см., например, Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)). Таким образом, такие гуманизированные антитела представляют собой химерные антитела, где по существу соответствующей последовательностью не являющихся человеком видов заменено менее одного интактного вариабельного домена человека.

[0219] Также можно использовать полностью человеческие антитела, содержащие в дополнение к каркасным и константным областям человека вариабельные области человека. Такие антитела можно получать различными известными в данной области способами. Например, способы *in vitro* включают использование рекомбинантных библиотек фрагментов антител человека, представленных на бактериофаге (например, Hoogenboom & Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991)). Подобным образом, антитела человека можно получать посредством введения локуса иммуноглобулина человека трансгенным животным, например, мышам, у которых полностью или частично инактивированы гены эндогенных иммуноглобулинов. Например, такой подход описан, в патентах США №№ 6150584, 5545807, 5545806, 5569825, 5625126, 5633425, 5661016.

[0220] Антитела, получаемые, как указано выше, можно очищать до однородности. Например, разделение и очистку антител можно проводить способами разделения и очистки обычных белков. Например, антитело можно разделять и выделять посредством соответствующим образом отобранного и комбинированного использования колоночной хроматографии, такой как аффинная хроматография, фильтр, ультрафильтрация, высаливание, диализ, электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии SDS и изоэлектрофокусирование (*Antibodies: A Laboratory Manual*. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), но не ограничиваясь ими. В качестве аффинной колонки можно использовать колонку с белком А и колонку с белком G. Иллюстративные колонки с белком А, которые можно использовать, включают, например, Hyper D, POROS и Sepharose F.F. (Pharmacia).

[0221] Примеры подходящих способов хроматографии за исключением аффинной хроматографии включают, например, ионообменную хроматографию, гидрофобную

хроматографию, гель-фильтрацию, хроматографию с обращенной фазой, адсорбционную хроматографию и т.п. (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996)).

Хроматографические способы можно проводить посредством жидкофазной хроматографии, такой как ВЭЖХ и ЖХБР.

[0222] Например, для измерения активности связывания антител по изобретению с антигеном можно использовать измерение оптической плотности, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), ферментный иммунологический анализ (EIA), радиоиммунологический анализ (RIA) и/или иммунофлуоресценцию. В ELISA антитело по настоящему изобретению иммобилизуют на планшете, на планшет наносят пептид по настоящему изобретению, а затем наносят образец, содержащий желаемое антитело, такой как супернатант культуры продуцирующих антитела клеток, или очищенные антитела. Затем наносят вторичное антитело, которое распознает первичное антитело и мечено ферментом, таким как щелочная фосфатаза, и планшет инкубируют. Затем после промывания к планшету добавляют субстрат фермента, такой как пара-нитрофенилфосфат, и для оценки антигенсвязывающей активности образца измеряют оптическую плотность. Для оценки активности антитела по настоящему изобретению можно использовать BIAcore (Pharmacia).

[0223] XIII. Векторы и клетки-хозяева:

Настоящее изобретение также относится к векторам и клеткам-хозяевам, в которые вводят полинуклеотид, кодирующий пептид по настоящему изобретению. Вектор по настоящему изобретению находит применение в качестве носителя полинуклеотидов, особенно ДНК, по настоящему изобретению в клетке-хозяине, для экспрессии пептида по настоящему изобретению или для введения полинуклеотида по настоящему изобретению для генотерапии.

[0224] Когда в качестве клетки-хозяина выбрана *E. coli* и вектор амплифицируют и в большом количестве продуцируют в *E. coli* (например, JM109, DH5-альфа, HB101 или XL1Blue), вектор должен содержать "ori" для амплификации в *E. coli* и маркерный ген для отбора трансформированных *E. coli* (например, ген устойчивости к лекарственному средству, отбираемый посредством такого лекарственного средства, как ампициллин, тетрациклин, канамицин, хлорамфеникол или т.п.). Например, можно использовать векторы ряда M13, векторы ряда pUC, pBR322, pBluescript, pCR-Script и т.д. Кроме того, для субклонирования и выделения кДНК также можно использовать pGEM-T, pDIRECT и pT7, а также описанные выше векторы. Когда вектор используют для продукции пептида по настоящему изобретению, применение может находить экспрессирующий вектор. Например, экспрессирующий вектор для экспрессии в *E. coli* для амплификации в *E. coli* должен обладать указанными выше характеристиками. Когда в качестве клетки-хозяина используют *E. coli*, такие как JM109, DH5-альфа, HB101 или XL1Blue, вектор должен содержать промотор, например, промотор lacZ (Ward et al., Nature, 341: 544-6 (1989); FASEB J., 6: 2422-7 (1992)), промотор araB (Better et al., Science, 240: 1041-3 (1988)), промотор T7 или т.п., который может эффективно экспрессировать желаемый ген в *E. coli*. В этом отношении вместо указанных выше векторов можно использовать, например, pGEX-5X-1 (Pharmacia), "QIAexpress system" (Qiagen), pEGFP и pET (в этом случае хозяин предпочтительно представляет собой BL21, который экспрессирует РНК-полимеразу T7). Кроме того, вектор также может содержать сигнальную последовательность для секреции пептида. Иллюстративная сигнальная последовательность, которая направляет секрецию пептида в периплазму *E. coli*, представляет собой сигнальную последовательность *pelB* (Lei et al., J. Bacteriol., 169:

4379 (1987)). Способы введения векторов в намеченные клетки-хозяева включают, например, способ с хлоридом кальция и способ электропорации.

[0225] В дополнение к *E. coli* для получения пептида по настоящему изобретению можно использовать, например, экспрессирующие векторы, получаемые у
 5 млекопитающих (например, pcDNA3 (Invitrogen) и pEGF-BOS (Nucleic Acids Res., 18(17): 5322 (1990)), pEF, pCDM8), экспрессирующие векторы, получаемые из клеток насекомых (например, "бакуловирусную экспрессирующую систему Bac-to-BAC" (GIBCO BRL), pBacPAK8), экспрессирующие векторы, получаемые из растений (например, pMH1, pMH2), экспрессирующие векторы, получаемые из вирусов животных (например, pHSV,
 10 pMV, pAdexLcw), экспрессирующие векторы, получаемые из ретровирусов (например, pZIpneo), экспрессирующий вектор, получаемый из дрожжей (например, "Pichia Expression Kit" (Invitrogen), pNV11, SP-Q01), и экспрессирующие векторы, получаемые из *Bacillus subtilis* (например, pPL608, pKTH50).

[0226] Для экспрессии вектора в клетках животных, таких как клетки CHO, COS или
 15 NIH3T3, вектор должен содержать промотор, необходимый для экспрессии в таких клетках, например, промотор SV40 (Mulligan et al., Nature, 277: 108 (1979)), промотор MMLV-LTR, промотор EF1-альфа (Mizushima et al., Nucleic Acids Res., 18: 5322 (1990)), промотор CMV и т.п., и предпочтительно маркерный ген для отбора трансформантов (например, ген устойчивости к лекарственному средству, отбираемый посредством
 20 лекарственного средства (например, неомицина, G418)). Примеры известных векторов с такими характеристиками включают, например, pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV и pOP13.

[0227] Далее в настоящем документе, настоящее изобретение описано более подробно на основании примеров. Однако хотя приведенные ниже материалы, способы и примеры
 25 могут служить для помощи специалисту в получении и использовании определенных вариантов настоящего изобретения, они предназначены только для иллюстрации аспектов настоящего изобретения и, таким образом, ни в коем случае не ограничивают объем настоящего изобретения. Как легко поймет специалист в данной области, в практическом осуществлении или тестировании настоящего изобретения можно
 30 использовать способы и материалы, подобные или эквивалентные способам и материалам, описываемым в настоящем документе.

Примеры

[0228] Эксперимент 1

Материалы и методы

35 Линии клеток

C1R, HLA-A, В негативную мутантную лимфобластоидную линию клеток, и COS7, линия клеток почки африканской зеленой мартышки, приобретали в ATCC.

[0229] Получение стимулирующих клеток, стабильно экспрессирующих HLA-A*0201

В качестве стимулирующих клеток использовали стабильную линию клеток C1R,
 40 экспрессирующую HLA-A*0201 (C1R-A02). Для получения стабильной линии клеток, проводили электропорацию при 1350В, с импульсом 20 мсек и 3 раза посредством системы трансфекции Neon (Invitrogen). Конструкции HLA-A*0201 трансфицировали с использованием вектора pcDNA3.1 (Invitrogen), несущим ген устойчивости к неомицину. Для отбора стабильно трансфицированных клеток на сутки 2 после трансфекции
 45 начинали отбор на G418 (Invitrogen). Через 2 недели после начала культивирования клетки высевали на 96-луночный планшет, содержащий среду для культивирования, дополненный G418. Через 30 суток после высевания, анализировали экспрессию HLA-A*0201 пролиферирующих клеток посредством FACS (BD Biosciences).

[0230] Отбор кандидатов из пептидов, получаемых из KNTC2

9-мерные и 10-мерные пептиды, получаемые из KNTC2, которые связываются с молекулой HLA-A*2402 или HLA-A*0201, теоретически рассчитывали с использованием сервера для теоретического расчета связывания "NetMHC3.2" (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>) (Buus et al., Tissue Antigens., 2003 Nov, 62(5):378-84; Nielsen et al., Protein Sci., 2003 May, 12(5):1007-17, Bioinformatics., 2004, Jun 12:20(9):1388-97). Эти пептиды синтезировали посредством Biosynthesis (Lewisville, Texas) стандартным способом твердофазного синтеза и очищали посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с обращенной фазой. Чистоту (>90%) и идентичность пептидов определяли посредством аналитической ВЭЖХ и масс-спектрометрического анализа соответственно. Пептиды растворяли в диметилсульфоксиде при 20 мг/мл и хранили при -80°C.

[0231] Индукция CTL in vitro

В качестве антигенпрезентирующих клеток для индукции ответа цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) против пептидов, презентуемых на лейкоцитарном антигене человека (HLA) использовали получаемые из моноцитов дендритные клетки (DC). DC получали in vitro, как описано в другом источнике (Nakahara S. et al., Cancer Res, 2003, 63(14): 4112-8). Конкретно, у здорового добровольца выделяли мононуклеарные клетки периферической крови (положительные по HLA-A*0201) посредством раствора Ficoll-Plaque (Pharmacia), отделяли посредством прикрепления к пластиковой чашке для тканевой культуры (Becton Dickinson), так, чтобы обогащать их в виде фракции моноцитов. Обогащенную моноцитами популяцию культивировали в присутствии 1000 МЕ/мл гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (R&D System) и 1000 МЕ/мл интерлейкина (IL)-4 (R&D System) в среде AIM-V (Invitrogen), содержащей 2% инактивированную нагреванием аутологичную сыворотку (AS). После 7 суток культивирования индуцированные цитокином DC сенсibilizировали 20 мкг/мл каждого из синтезированных пептидов в присутствии 3 мкг/мл бета-2-микроглобулина в течение 3 часов при 37°C в среде AIM-V. Показано, что получаемые клетки на своей клеточной поверхности экспрессируют ассоциированные с DC молекулы, такие как CD80, CD83, CD86 и HLA класса II (данные не показаны). Затем такие сенсibilizированные пептидами DC инактивировали рентгеновским излучением (20 Гр) и смешиванием в отношении 1:20 с аутологичными CD8⁺ Т-клетками, получаемыми посредством положительного отбора с использованием набора CD8 Positive Isolation (Dyna). Эти культуры помещали в 48-луночные планшеты (Corning), каждая лунка содержала $1,5 \times 10^4$ сенсibilizированных пептидом DC, 3×10^5 CD8⁺ Т-клеток и 10 нг/мл IL-7 (R&D System) в 0,5 мл среды AIM-V/2% AS. Через трое суток к этим культурам добавляли IL-2 (CHIRON) до конечной концентрации 20 МЕ/мл. На сутки 7 и 14 Т-клетки дополнительно стимулировали аутологичными сенсibilizированными пептидами DC. Каждый раз DC получали одним и тем же способом, описанным выше. CTL тестировали по отношению к сенсibilizированным пептидам клеткам C1R-A02 после 3 стадии стимуляции пептидами на сутки 21 (Tanaka H. et al., Br. J. Cancer, 2001, 84(1): 94-9; Umamo Y. et al., Br. J. Cancer, 2001, 84(8): 1052-7; Uchida N. et al., Clin. Cancer Res., 2004, 10(24): 8577-86; Suda T. et al., Cancer Sci., 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T. et al., Cancer Sci., 2005, 96(8): 498-506).

[0232] Способ наращивания CTL

CTL наращивали в культуре способом, аналогичным способу, описанному Riddell et al. (Walter E.A. et al., N. Engl. J. Med., 1995, 333(16): 1038-44; Riddell S.R. et al., Nat. Med.,

1996, 2(2): 216-23). Общий объем 5×10^4 CTL суспендировали в 25 мл среды AIM-V/5% AS с 2 типами В-лимфобластоидных линий клеток человека, инактивированных митомицином С, в присутствии 40 нг/мл моноклонального антитела к CD3 (Pharmingen). Через сутки после инициации культур к культурам добавляли 120 МЕ/мл IL-2. Культуры подпитывали свежей средой AIM-V/5% AS, содержащей 30 МЕ/мл IL-2, на сутки 5, 8 и 11 (Tanaka H. et al., Br. J. Cancer, 2001, 84(1): 94-9; Umamo Y. et al., Br. J. Cancer, 2001, 84(8): 1052-7; Uchida N. et al., Clin. Cancer Res., 2004, 10(24): 8577-86; Suda T. et al., Cancer Sci., 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T. et al., Cancer Sci., 2005, 96(8): 498-506).

[0233] Получение клонов CTL

Делали разведения с получением 0,3, 1 и 3 CTL/лунку в 96-луночном планшете для микротитрования с лунками с круглым дном (Nalge Nunc International). CTL

культивировали при 1×10^4 клеток/лунку с 2 типами В-лимфобластоидных линий клеток человека, 30 нг/мл антител к CD3 и 125 Ед/мл IL-2 всего в 150 мкл/лунку среды AIM-V, содержащей 5% AS. Через 10 суток к среде добавляли 50 мкл/лунку IL-2 с получением конечной концентрации IL-2 125 Ед/мл. Активность CTL тестировали на 14 сутки, и клоны CTL наращивали способом, аналогичным способу, описанному выше (Uchida N. et al., Clin. Cancer Res., 2004 Dec, 10(24): 8577-86; Suda T. et al., Cancer Sci., 2006 May, 97(5): 411-9; Watanabe T. et al., Cancer Sci., 2005 Aug, 96(8): 498-506).

[0234] Специфическая активность CTL

Для анализа специфической активности CTL проводили анализ ELISPOT IFN-гамма и ELISA IFN-гамма. В качестве стимулирующих клеток получали сенсibilизированные пептидом клетки C1R-A02 (1×10^4 /лунку). В качестве иммунореактивных клеток использовали культивируемые клетки в 48-луночном планшете, линии CTL и клоны CTL. Анализ ELISPOT IFN-гамма и анализ ELISA IFN-гамма проводили в соответствии со способом производителя.

[0235] Получение клеток, принудительно экспрессирующих любой из гена-мишени и HLA-A*0201 или оба кДНК, кодирующие открытые рамки считывания генов-мишеней или HLA-A*0201, амплифицировали посредством ПЦР. Продукты амплификации ПЦР клонировали в экспрессирующий вектор. Плазмиды трансфицировали в клетки COS7, которые представляют собой линию клеток, "нулевую" по отношению к генам-мишеням и HLA-A*0201, с использованием липофектамина 2000 (Invitrogen) по инструкциям производителя. Через 2 суток после трансфекции трансфицированные клетки собирали с использованием версена (Invitrogen) и использовали в качестве клеток-мишеней (5×10^4 клеток/лунку) для анализа активности CTL.

[0236] Результаты

Прогнозирование связывающих HLA-A*0201 пептидов, получаемых из KNTC2

Таблицы 1a и 1b демонстрируют связывающие HLA-A02 9-мерные и 10-мерные пептиды из KNTC2 в порядке величины аффинности связывания. Всего для определения пептидов-эпитопов выбрали и исследовали 76 пептидов с потенциалом способности связывания HLA-A02.

[0237] []

[Таблица 1a]			
Связывающие HLA-A*0201 9-мерные пептиды, получаемые из KNTC2			
Начальное положение	Последовательность аминокислот	Kd (нМ)	SEQ ID NO
330	GLNEEIARV	14	1
131	FLYGFLCPS	19	2
181	IVAALVWLI	21	3

5	274	ALNEQIARL	25	4
	549	GLSEAMNEL	30	5
	327	KLNGLNEEI	59	6
	184	ALVWLIDCI	98	7
	588	MVATHVGSV	124	8
10	464	LLNETEEEI	126	9
	599	HLEEQIAKV	127	10
	323	ILDQKLNGL	162	11
	581	NLQRLEEMV	182	12
	355	IIDNQKYSV	289	13
15	91	FIQQCIRQL	325	14
	449	CLVKYRAQV	356	15
	176	HTWPHIVAA	451	16
	127	KIFTFLYGF	454	17
	481	GLEDTLEQL	458	18
20	180	HIVAALVWL	478	19
	417	KLARKLCLI	550	20
	218	GIMHNKFL	831	21
	163	ALSKSSMYT	1032	22
	585	LLEMVATHV	1060	23
25	72	GIFSSSEKI	1498	24
	411	QLAEYHKLA	1592	25
	129	FTFLYGFLC	1659	26
	410	TQLAEYHKL	1725	27
	560	VQREYQLVV	1938	28
30	564	YQLWQTTT	2253	29
	492	MITESKRSV	3246	30
	502	TLKEEVQKL	3280	31
	534	SLEKHKL	3460	32
	485	TLEQLNAMI	3546	33
35	316	NLESHSAIL	4545	34
	361	YSVADIERI	4545	35

[0238]

30	[Таблица 1b]			
	Связывающие HLA-A*0201 10-мерные пептиды, получаемые из KNTC2			
35	Начальное положение	Последовательность аминокислот	Kd (нМ)	SEQ ID NO
	584	RLLEMVATHV	24	36
	131	FLYGFLCPSY	37	37
	313	YMSNLESHSA	51	38
	393	KLWNEELKYA	55	39
40	163	ALSKSSMYTV	56	40
	127	KIFTFLYGFL	135	41
	125	FLKIFTFLYG	164	42
	354	NIIDNQKYSV	245	43
	113	SMKSLQAPSV	305	44
45	491	AMITESKRSV	410	45
	463	ELLNETEEEI	532	46
	180	HIVAALVWLI	564	47
	187	WLIDCIKIHT	586	48
	162	FALSKSSMYT	668	49
50	614	CMSEDLSENI	879	50
	256	DLFNVDAFKL	1047	51
	509	KLDDLYQQKI	1133	52
	322	AILDQKLNGL	1184	53
	15	SMQELRSQDV	1270	54

5	183	AALVWLIDCI	1330	55
	541	LLESTVNQGL	1339	56
	133	YGFLCPSYEL	1489	57
	223	KLFLDYTIKC	1616	58
	273	RALNEQIARL	1618	59
10	225	FLDYTIKCYE	1778	60
	587	EMVATHVGSV	1815	61
	135	FLCPSYELPD	1826	62
	228	YTIKCYESFM	2153	63
	253	KLKDLFNVDA	2196	64
15	129	FTFLYGFLCP	2494	65
	581	NLQRLLEMVA	2681	66
	168	SMYTVGAPHT	2717	67
	185	LVWLIDCIKI	2778	68
	176	HTWPHIVAAL	3257	69
20	155	FKDLGYPFAL	3439	70
	259	NVDAFKLES	3792	71
	236	FMSGADSFDE	4152	72
	219	IMHNKLFLDY	4307	73
	327	KLNLNEEIA	4308	74
25	298	KLKASLQGDV	4873	75
	580	NNLQRLLEMV	4935	76

Начальное положение указывает номер остатка аминокислоты с N-конца KNTC2 константа диссоциации [Kd (нМ)] получена из "NetMHC3.2".

[0239] Индукция CTL теоретически спрогнозированными пептидами из KNTC2, рестриктированными по HLA-A*0201

CTL для этих пептидов, получаемых из KNTC2, получали по протоколам, как описано в "Материалах и методах". Специфичную в отношении пептидов активность CTL детектировали посредством анализа ELISPOT IFN-гамма (фигура 1). Лунка № 8 с KNTC2-A02-9-131 (SEQ ID NO: 2) (a), № 4 с KNTC2-A02-9-181 (SEQ ID NO: 3) (b), № 7 с KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO: 7) (c), № 5 с KNTC2-A02-9-127 (SEQ ID NO: 17) (d), № 3 с KNTC2-A02-10-127 (SEQ ID NO: 41) (e), № 2 с KNTC2-A02-10-322 (SEQ ID NO: 53) (f) и № 6 с KNTC2-A02-10-185 (SEQ ID NO: 68) (g) продемонстрировали сильную продукцию IFN-гамма по сравнению с контрольными лунками. С другой стороны специфической активности CTL при стимуляции другими пептидами, приведенными в таблице 1a и b, не детектировали, несмотря на тот факт, что такие пептиды обладали потенциалом активности связывания с HLA-A*0201. В качестве типичных отрицательных данных, специфической продукции IFN-гамма CTL, стимулированными KNTC-A02-9-330 (SEQ ID NO: 1) (h), не наблюдали. Взяты вместе, эти результаты позволяют предположить, что 7 выбранных пептидов, полученных из KNTC2, могут индуцировать эффективные CTL.

[0240] Получение линии и клона CTL против полученного из KNTC2 пептида

Клетки, которые продемонстрировали специфическую в отношении пептидов активность CTL, детектированные посредством анализа ELISPOT IFN-гамма в лунках № 8 с KNTC2-A02-9-131 (SEQ ID NO: 2) (a), № 4 с KNTC2-A02-9-181 (SEQ ID NO: 3) (b) и № 7 с KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO: 7) (c), размножали и получали линии CTL. Активность CTL этих линий CTL измеряли посредством ELISA IFN-гамма (фигура 2). Эти линии CTL продемонстрировали сильную продукцию IFN-гамма против клеток-мишеней сенсibilизированных соответствующим пептидом по сравнению с клетками-мишенями без сенсibilизации пептидом. Кроме того, посредством лимитирующего разведения из линий CTL получали клоны CTL, как описано в "Материалах и методах",

и продукцию IFN-гамма клонами CTL против клеток C1R-A02, сенсibilизированных соответствующим пептидом, измеряли посредством ELISA IFN-гамма. Сильную продукцию IFN-гамма наблюдали у клонов CTL, стимулированных KNTC2-A02-9-131 (SEQ ID NO: 2) (a), KNTC2-A02-9-181 (SEQ ID NO: 3) (b) и KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO: 7) (c) (фигура 3).

[0241] Специфическая активность CTL против клеток-мишеней, экспрессирующих KNTC2 и HLA-A*0201

Полученную линию CTL, индуцированную против пептида KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO: 7) тестировали на способность распознавать клетки-мишени, экспрессирующие KNTC2 и молекулу HLA-A*0201. В качестве стимулирующих клеток получали клетки COS7, трансфицированные полноразмерным KNTC2 и геном HLA-A*0201 (специфическая модель для клеток-мишеней, экспрессирующих KNTC2 и ген HLA-A*0201), а в качестве контроля использовали клетки COS7, трансфицированные или полноразмерным KNTC2, или HLA-A*0201. На фигуре 4, линия CTL, стимулированная KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO: 7), продемонстрировала сильную активность CTL против клеток COS7, экспрессирующих KNTC2 и HLA-A*0201. С другой стороны, значимой специфической активности CTL против контролей не детектировали. Таким образом, эти данные отчетливо демонстрируют, что пептид KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO: 7) претерпевает эндогенный процессинг и экспрессируется на клетках-мишенях с молекулой HLA-A*0201, и его распознают CTL. Эти результаты свидетельствуют, что этот пептид, полученный из KNTC2, может быть пригоден для применения в вакцинах против злокачественных опухолей для пациентов с экспрессирующими KNTC2 опухолями.

[0242] Анализ гомологии антигенных пептидов

CTL, стимулированные KNTC2-A02-9-131 (SEQ ID NO: 2), KNTC2-A02-9-181 (SEQ ID NO: 3), KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO: 7), KNTC2-A02-9-127 (SEQ ID NO: 17), KNTC2-A02-10-127 (SEQ ID NO: 41), KNTC2-A02-10-322 (SEQ ID NO: 53) и KNTC2-A02-10-185 (SEQ ID NO: 68) гомологичны пептиду, полученному из других молекулы, для которых известно, что они сенсibilизируют иммунную систему человека. Для исключения этой возможности проводили анализы гомологии для этих пептидных последовательностей с использованием запросов к алгоритму BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>), которые не выявили значимой гомологии последовательностей. Результаты анализов гомологии свидетельствуют, что последовательности KNTC2-A02-9-131 (SEQ ID NO: 2), KNTC2-A02-9-181 (SEQ ID NO: 3), KNTC2-A02-9-184 (SEQ ID NO: 7), KNTC2-A02-9-127 (SEQ ID NO: 17), KNTC2-A02-10-127 (SEQ ID NO: 41), KNTC2-A02-10-322 (SEQ ID NO: 53) и KNTC2-A02-10-185 (SEQ ID NO: 68) являются уникальными, и, таким образом, по имеющимся у авторов заявкам сведениям вероятность того, что эти молекулы вызовут непредусмотренный иммунный ответ на какую-либо неродственную молекулу, является небольшой.

В заключение следует отметить, что новые пептиды-эпитопы HLA-A*0201, полученные из KNTC2, идентифицированные в настоящем документе, могут найти применение в области иммунотерапии злокачественных опухолей.

Применимость в промышленности

[0243] Настоящее изобретение относится к новым пептидам-эпитопам, получаемым из KNTC2, которые могут индуцировать сильный и специфический противоопухолевый иммунный ответ и находят применимость для широкого спектра типов злокачественных опухолей. Такие пептиды могут находить применение в качестве пептидных вакцин против заболеваний, ассоциированных с KNTC2, например, злокачественных опухолей, более конкретно, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака шейки матки,

холангиокарциномы, хронического миелолейкоза (СМЛ), колоректального рака, рака пищевода, немелкоклеточного рака легких (NSCLC), лимфомы, остеосаркомы, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточного рака, мелкоклеточного рака легких (SCLC) и опухоли мягких тканей.

[0244] Несмотря на то, что настоящее изобретение подробно и со ссылкой на его конкретные варианты осуществления описано в настоящем документе, следует понимать, что приведенное выше описание является иллюстративным и пояснительным по характеру и предназначено для иллюстрации настоящего изобретения и его предпочтительных вариантов осуществления. Посредством общепринятого экспериментирования специалист в данной области легко поймет, что в настоящем изобретении можно проводить различные изменения и модификации, не выходя за рамки сущности и объема настоящего изобретения, пределы и границы которого определены прилагаемой формулой изобретения.

(57) Формула изобретения

1. Выделенный пептид со способностью к индукции цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) в присутствии антигенпрезентирующей клетки (APC), несущей HLA-A*0201, где пептид состоит из последовательности аминокислот (a) или (b) ниже:

(a) последовательность аминокислот, выбранная из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3, 7, 17, 41, 53 и 68;

(b) последовательность аминокислот, в которой в последовательности аминокислот, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3, 7, 17, 41, 53 и 68, замещены 1 или 2 аминокислоты, где указанные замены выбраны из группы, состоящей из (i) и (ii) ниже

(i) вторая аминокислота с N-конца представляет собой лейцин или метионин; и

(ii) C-концевая аминокислота представляет собой валин или лейцин.

2. Пептид по п.1, где пептид состоит из последовательности аминокислот, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3, 7, 17, 41, 53 и 68.

3. Выделенный полинуклеотид, кодирующий пептид по п.1 или 2.

4. Композиция для индукции CTL, где индукция происходит в присутствии молекулы HLA-A*0201, где композиция содержит по меньшей мере один активный ингредиент в подходящей дозе, выбранный из группы, состоящей из:

(a) пептида по п.1 или 2;

(b) APC, которая презентует на своей поверхности комплекс HLA-A*0201 и пептида по п.1 или 2; и

(c) экзосомы, которая презентует на своей поверхности комплекс HLA-A*0201 и пептида по п.1 или 2.

5. Фармацевтическая композиция для лечения и/или профилактики злокачественной опухоли, экспрессирующей KNTC2 и HLA-A*0201, и/или профилактики ее послеоперационного рецидива, где композиция содержит по меньшей мере один активный ингредиент в подходящей дозе, выбранный из группы, состоящей из:

(a) пептида по п.1 или 2;

(b) APC, которая презентует на своей поверхности комплекс HLA-A*0201 и пептида по п.1 или 2; и

(c) экзосомы, которая презентует на своей поверхности комплекс HLA-A*0201 и пептида по п.1 или 2.

6. Способ индукции APC со способностью индукции CTL, где способ включает стадию приведения APC, несущей HLA-A*0201, в контакт с пептидом по п.1 или 2.

7. Способ индукции CTL, где способ включает стадию, выбранную из группы,

состоящей из:

(а) совместного культивирования CD8-положительной Т-клетки с APC, которая презентует на своей поверхности комплекс HLA-A*0201 и пептида по п.1 или 2; и

(b) совместного культивирования CD8-положительной Т-клетки с экзосомой, которая презентует на своей поверхности комплекс HLA-A*0201 и пептида по п.1 или 2.

8. Выделенная APC для индуцирования CTL, которая презентует на своей поверхности комплекс HLA-A*0201 и пептида по п.1 или 2.

9. APC по п.8, индуцированная способом по п.7.

10. Способ индукции иммунного ответа против злокачественной опухоли, экспрессирующей KNTC2 и HLA-A*0201, у индивидуума, где способ включает стадию введения индивидууму композиции, содержащей пептид по п.1 или 2.

11. Вектор для получения пептида по п.1 или 2, содержащий последовательность нуклеотидов, кодирующую пептид по п.1 или 2.

12. Клетка-хозяин для получения пептида по п.1 или 2, трансформированная или трансфицированная вектором по п.11.

13. Способ скрининга на пептид со способностью индукции CTL, который обладает специфической цитотоксической активностью против клетки, которая презентует фрагмент, получаемый из KNTC2, где способ включает стадии:

(i) предоставления последовательности-кандидата, состоящей из последовательности аминокислот, модифицированной посредством

замены, делеции, вставки и/или добавления в исходной последовательности аминокислот одного, двух или нескольких остатков аминокислот, где исходная последовательность аминокислот выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3, 7, 17, 41, 53 и 68;

(ii) выбора последовательности-кандидата, которая не обладает значимой гомологией с пептидами, получаемыми из любых известных продуктов генов человека, отличных от KNTC2;

(iii) приведения пептида, состоящего из последовательности-кандидата, выбранной на стадии (ii), в контакт с антигенпрезентирующей клеткой;

(iv) приведения антигенпрезентирующей клетки со стадии (iii) в контакт с CD8-положительной Т-клеткой; и

(v) идентификации пептида, способность к индукции CTL которого является такой же или более высокой, чем у пептида, состоящего из исходной последовательности аминокислот.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.
 <120> ПЕПТИДЫ KNTC2 И СОДЕРЖАЩИЕ ИХ ВАКЦИНЫ
 <130> ONC-A1304P
 <150> US 61/777,334
 <151> 2013-03-12
 <160> 84
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> пептид, полученный из KNTC2
 <400> 1
 Gly Leu Asn Glu Glu Ile Ala Arg Val
 1 5
 <210> 2
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> пептид, полученный из KNTC2
 <400> 2
 Phe Leu Tyr Gly Phe Leu Cys Pro Ser
 1 5
 <210> 3
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> пептид, полученный из KNTC2
 <400> 3
 Ile Val Ala Ala Leu Val Trp Leu Ile
 1 5
 <210> 4
 <211> 9
 <212> БЕЛОК

2

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 4

Ala Leu Asn Glu Gln Ile Ala Arg Leu
1 5

<210> 5

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 5

Gly Leu Ser Glu Ala Met Asn Glu Leu
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 6

Lys Leu Asn Gly Leu Asn Glu Glu Ile
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 7

Ala Leu Val Trp Leu Ile Asp Cys Ile
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> пептид, полученный из KNTC2

3

<400> 8

Met Val Ala Thr His Val Gly Ser Val
 1 5

<210> 9

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 9

Leu Leu Asn Glu Thr Glu Glu Glu Ile
 1 5

<210> 10

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 10

His Leu Glu Glu Gln Ile Ala Lys Val
 1 5

<210> 11

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 11

Ile Leu Asp Gln Lys Leu Asn Gly Leu
 1 5

<210> 12

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 12

Asn Leu Gln Arg Leu Leu Glu Met Val

4

1 5

<210> 13
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 13

Ile Ile Asp Asn Gln Lys Tyr Ser Val
 1 5

<210> 14
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 14

Phe Ile Gln Gln Cys Ile Arg Gln Leu
 1 5

<210> 15
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 15

Cys Leu Val Lys Tyr Arg Ala Gln Val
 1 5

<210> 16
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 16

His Thr Trp Pro His Ile Val Ala Ala
 1 5

<210> 17

5

<211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 17

Lys Ile Phe Thr Phe Leu Tyr Gly Phe
 1 5

<210> 18
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 18

Gly Leu Glu Asp Thr Leu Glu Gln Leu
 1 5

<210> 19
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 19

His Ile Val Ala Ala Leu Val Trp Leu
 1 5

<210> 20
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 20

Lys Leu Ala Arg Lys Leu Lys Leu Ile
 1 5

<210> 21
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

6

<220>
 <223> пептид, полученный из KNTC2
 <400> 21
 Gly Ile Met His Asn Lys Leu Phe Leu
 1 5

<210> 22
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> пептид, полученный из KNTC2
 <400> 22

Ala Leu Ser Lys Ser Ser Met Tyr Thr
 1 5

<210> 23
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> пептид, полученный из KNTC2
 <400> 23

Leu Leu Glu Met Val Ala Thr His Val
 1 5

<210> 24
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> пептид, полученный из KNTC2
 <400> 24

Gly Ile Phe Ser Ser Ser Glu Lys Ile
 1 5

<210> 25
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> пептид, полученный из KNTC2
 <400> 25

7

Gln Leu Ala Glu Tyr His Lys Leu Ala
1 5

<210> 26
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 26

Phe Thr Phe Leu Tyr Gly Phe Leu Cys
1 5

<210> 27
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 27

Thr Gln Leu Ala Glu Tyr His Lys Leu
1 5

<210> 28
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 28

Val Gln Arg Glu Tyr Gln Leu Val Val
1 5

<210> 29
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 29

Tyr Gln Leu Val Val Gln Thr Thr Thr
1 5

<210> 30
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 30

Met Ile Thr Glu Ser Lys Arg Ser Val
 1 5

<210> 31
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 31

Thr Leu Lys Glu Glu Val Gln Lys Leu
 1 5

<210> 32
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 32

Ser Leu Glu Lys His Lys His Leu Leu
 1 5

<210> 33
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 33

Thr Leu Glu Gln Leu Asn Ala Met Ile
 1 5

<210> 34
 <211> 9
 <212> БЕЛОК

9

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 34

Asn	Leu	Glu	Ser	His	Ser	Ala	Ile	Leu
1					5			

<210> 35

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 35

Tyr	Ser	Val	Ala	Asp	Ile	Glu	Arg	Ile
1					5			

<210> 36

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 36

Arg	Leu	Leu	Glu	Met	Val	Ala	Thr	His	Val
1				5					10

<210> 37

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 37

Phe	Leu	Tyr	Gly	Phe	Leu	Cys	Pro	Ser	Tyr
1				5					10

<210> 38

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> пептид, полученный из KNTC2

10

<400> 38

Tyr Met Ser Asn Leu Glu Ser His Ser Ala
 1 5 10

<210> 39

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 39

Lys Leu Trp Asn Glu Glu Leu Lys Tyr Ala
 1 5 10

<210> 40

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 40

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

<210> 41

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 41

Lys Ile Phe Thr Phe Leu Tyr Gly Phe Leu
 1 5 10

<210> 42

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 42

Phe Leu Lys Ile Phe Thr Phe Leu Tyr Gly

11

1 5 10

<210> 43
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 43

Asn Ile Ile Asp Asn Gln Lys Tyr Ser Val
 1 5 10

<210> 44
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 44

Ser Met Lys Ser Leu Gln Ala Pro Ser Val
 1 5 10

<210> 45
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 45

Ala Met Ile Thr Glu Ser Lys Arg Ser Val
 1 5 10

<210> 46
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 46

Glu Leu Leu Asn Glu Thr Glu Glu Glu Ile
 1 5 10

<210> 47

12

<211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 47

His Ile Val Ala Ala Leu Val Trp Leu Ile
 1 5 10

<210> 48
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 48

Trp Leu Ile Asp Cys Ile Lys Ile His Thr
 1 5 10

<210> 49
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 49

Phe Ala Leu Ser Lys Ser Ser Met Tyr Thr
 1 5 10

<210> 50
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 50

Cys Met Ser Glu Asp Leu Ser Glu Asn Ile
 1 5 10

<210> 51
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

13

<220>
 <223> пептид, полученный из KNTC2

 <400> 51

 Asp Leu Phe Asn Val Asp Ala Phe Lys Leu
 1 5 10

 <210> 52
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> пептид, полученный из KNTC2

 <400> 52

 Lys Leu Asp Asp Leu Tyr Gln Gln Lys Ile
 1 5 10

 <210> 53
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> пептид, полученный из KNTC2

 <400> 53

 Ala Ile Leu Asp Gln Lys Leu Asn Gly Leu
 1 5 10

 <210> 54
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> пептид, полученный из KNTC2

 <400> 54

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

 <210> 55
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> пептид, полученный из KNTC2

 <400> 55

14

Ala Ala Leu Val Trp Leu Ile Asp Cys Ile
1 5 10

<210> 56
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 56

Leu Leu Glu Ser Thr Val Asn Gln Gly Leu
1 5 10

<210> 57
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 57

Tyr Gly Phe Leu Cys Pro Ser Tyr Glu Leu
1 5 10

<210> 58
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 58

Lys Leu Phe Leu Asp Tyr Thr Ile Lys Cys
1 5 10

<210> 59
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 59

Arg Ala Leu Asn Glu Gln Ile Ala Arg Leu
1 5 10

15

<210> 60
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 60

Phe Leu Asp Tyr Thr Ile Lys Cys Tyr Glu
 1 5 10

<210> 61
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 61

Glu Met Val Ala Thr His Val Gly Ser Val
 1 5 10

<210> 62
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 62

Phe Leu Cys Pro Ser Tyr Glu Leu Pro Asp
 1 5 10

<210> 63
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 63

Tyr Thr Ile Lys Cys Tyr Glu Ser Phe Met
 1 5 10

<210> 64
 <211> 10
 <212> БЕЛОК

16

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 64

Lys	Leu	Lys	Asp	Leu	Phe	Asn	Val	Asp	Ala
1				5					10

<210> 65

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 65

Phe	Thr	Phe	Leu	Tyr	Gly	Phe	Leu	Cys	Pro
1				5					10

<210> 66

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 66

Asn	Leu	Gln	Arg	Leu	Leu	Glu	Met	Val	Ala
1				5					10

<210> 67

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 67

Ser	Met	Tyr	Thr	Val	Gly	Ala	Pro	His	Thr
1				5					10

<210> 68

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> пептид, полученный из KNTC2

17

<400> 68

Leu Val Trp Leu Ile Asp Cys Ile Lys Ile
 1 5 10

<210> 69

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 69

His Thr Trp Pro His Ile Val Ala Ala Leu
 1 5 10

<210> 70

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 70

Phe Lys Asp Leu Gly Tyr Pro Phe Ala Leu
 1 5 10

<210> 71

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 71

Asn Val Asp Ala Phe Lys Leu Glu Ser Leu
 1 5 10

<210> 72

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 72

Phe Met Ser Gly Ala Asp Ser Phe Asp Glu

18

1 5 10

<210> 73
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 73

Ile Met His Asn Lys Leu Phe Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 74
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 74

Lys Leu Asn Gly Leu Asn Glu Glu Ile Ala
1 5 10

<210> 75
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 75

Lys Leu Lys Ala Ser Leu Gln Gly Asp Val
1 5 10

<210> 76
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> пептид, полученный из KNTC2

<400> 76

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

<210> 77

<211> 2209
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

 <400> 77
 actgcgcgcg tcgtgcgtaa tgacgtcagc gccggcgag aatttcaaat tcgaacggct
 60

 ttggcgggcc gaggaaggac ctggtgtttt gatgaccgct gtctgtcta gcagatactt
 120

 gcacggttta cagaaattcg gtccctgggt cgtgtcagga aactggaaaa aaggtcataa
 180

 gcatgaagcg cagttcagtt tccagcgggt gtgctggccg cctctccatg caggagttaa
 240

 gatcccagga tgtaaataaa caaggcctct ataccctca aaccaaagag aaaccaacct
 300

 ttggaaagtt gagtataaac aaaccgacat ctgaaagaaa agtctcgcta ttggcaaaa
 360

 gaactagtgg acatggatcc cggaatagtc aacttggtat attttccagt tctgagaaaa
 420

 tcaaggaccc gagaccactt aatgacaaag cattcattca gcagtgtatt cgacaactct
 480

 gtgagtttct tacagaaaat ggttatgcac ataatgtgtc catgaaatct ctacaagctc
 540

 cctctgttaa agacttcctg aagatcttca catttcttta tggcttcctg tgccctcat
 600

 acgaacttcc tgacacaaag tttgaagaag aggttccaag aatctttaa gaccttgggt
 660

 atccttttgc actatccaaa agctccatgt acacagtggg ggctcctcat acatggcctc
 720

 acattgtggc agccttagtt tggctaatag actgcatcaa gatacatact gccatgaaa
 780

 aaagctcacc tttatttgat gatgggcagc cttggggaga agaaactgaa gatggaatta
 840

 tgcataataa gttgtttttg gactacacca taaaatgcta tgagagtttt atgagtgggtg
 900

 ccgacagctt tgatgagatg aatgcagagc tgcagtcaaa actgaaggat ttatttaatg
 960

 tggatgcttt taagctggaa tcattagaag caaaaaacag agcattgaat gaacagattg
 1020

 caagattgga acaagaaaga gaaaaagaac cgaatcgtct agagtcgttg agaaaactga
 1080

20

aggcttcctt acaaggagat gttcaaaagt atcaggcata catgagcaat ttggagtctc
1140

attcagccat tcttgaccag aaattaaatg gtctcaatga ggaaattgct agagtagaac
1200

tagaatgtga aacaataaaa caggagaaca ctcgactaca gaatatcatt gacaaccaga
1260

agtactcagt tgcagacatt gagcgaataa atcatgaaag aatgaattg cagcagacta
1320

ttaataaatt aaccaaggac ctggaagctg aacaacagaa gttgtggaat gaggagttaa
1380

aatatgccag aggcaaagaa gcgattgaaa cacaattagc agagtatcac aaattggcta
1440

gaaaattaaa acttattcct aaagggtgctg agaattccaa aggttatgac tttgaaatta
1500

agtttaatcc cgaggctggt gccaaactgcc ttgtcaaata cagggtcaa gtttatgtac
1560

ctcttaagga actcctgaat gaaactgaag aagaaattaa taaagcccta aataaaaaaa
1620

tgggtttgga ggatacttta gaacaattga atgcaatgat aacagaaaagc aagagaagtg
1680

tgagaactct gaaagaagaa gttcaaaagc tggatgatct ttaccaacaa aaaattaag
1740

aagcagagga agaggatgaa aaatgtgcc a gtgagcttga gtccttgag aaacacaagc
1800

acctgctaga aagtactgtt aaccaggggc tcagtgaagc tatgaatgaa ttagatgctg
1860

ttcagcgga ataccaacta gttgtgcaaa ccacgactga agaaagacga aaagtgggaa
1920

ataacttgca acgtctgtta gagatggttg ctacacatgt tgggtctgta gagaaacatc
1980

ttgaggagca gattgctaaa gttgatagag aatatgaaga atgcatgtca gaagatctct
2040

cggaaaatat taaagagatt agagataagt atgagaagaa agctactcta attaagtctt
2100

ctgaagaatg aagataaaat gttgatcatg tatatatatc catagtgaat aaaattgtct
2160

cagtaaagtg taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
2209

<210> 78

<211> 2150

21

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> КОДИРУЮЩАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<222> (105)..(2033)

<400> 78

ctcgagccac gaaggccccg ctgtcctgtc tagcagatac ttgcacgggt tacagaaatt
60cgggtccctgg gtcgtgtcag gaaactggaa aaaaggtcat aagc atg aag cgc agt
116Met Lys Arg Ser
1tca gtt tcc agc ggt ggt gct ggc cgc ctc tcc atg cag gag tta aga
164Ser Val Ser Ser Gly Gly Ala Gly Arg Leu Ser Met Gln Glu Leu Arg
5 10 15 20tcc cag gat gta aat aaa caa ggc ctc tat acc cct caa acc aaa gag
212Ser Gln Asp Val Asn Lys Gln Gly Leu Tyr Thr Pro Gln Thr Lys Glu
25 30 35aaa cca acc ttt gga aag ttg agt ata aac aaa ccg aca tct gaa aga
260Lys Pro Thr Phe Gly Lys Leu Ser Ile Asn Lys Pro Thr Ser Glu Arg
40 45 50aaa gtc tcg cta ttt ggc aaa aga act agt gga cat gga tcc cgg aat
308Lys Val Ser Leu Phe Gly Lys Arg Thr Ser Gly His Gly Ser Arg Asn
55 60 65agt caa ctt ggt ata ttt tcc agt tct gag aaa atc aag gac ccg aga
356Ser Gln Leu Gly Ile Phe Ser Ser Ser Glu Lys Ile Lys Asp Pro Arg
70 75 80cca ctt aat gac aaa gca ttc att cag cag tgt att cga caa ctc tgt
404Pro Leu Asn Asp Lys Ala Phe Ile Gln Gln Cys Ile Arg Gln Leu Cys
85 90 95 100gag ttt ctt aca gaa aat ggt tat gca cat aat gtg tcc atg aaa tct
452Glu Phe Leu Thr Glu Asn Gly Tyr Ala His Asn Val Ser Met Lys Ser
105 110 115cta caa gct ccc tct gtt aaa gac ttc ctg aag atc ttc aca ttt ctt
500Leu Gln Ala Pro Ser Val Lys Asp Phe Leu Lys Ile Phe Thr Phe Leu
120 125 130tat ggc ttc ctg tgc ccc tca tac gaa ctt cct gac aca aag ttt gaa
548

Tyr Gly Phe Leu Cys Pro Ser Tyr Glu Leu Pro Asp Thr Lys Phe Glu

135	140	145
gaa gag gtt cca aga atc ttt aaa gac ctt ggg tat cct ttt gca cta		
596		
Glu Glu Val Pro Arg Ile Phe Lys Asp Leu Gly Tyr Pro Phe Ala Leu		
150	155	160
tcc aaa agc tcc atg tac aca gtg ggg gct cct cat aca tgg cct cac		
644		
Ser Lys Ser Ser Met Tyr Thr Val Gly Ala Pro His Thr Trp Pro His		
165	170	175 180
att gtg gca gcc tta gtt tgg cta ata gac tgc atc aag ata cat act		
692		
Ile Val Ala Ala Leu Val Trp Leu Ile Asp Cys Ile Lys Ile His Thr		
	185	190 195
gcc atg aaa gaa agc tca cct tta ttt gat gat ggg cag cct tgg gga		
740		
Ala Met Lys Glu Ser Ser Pro Leu Phe Asp Asp Gly Gln Pro Trp Gly		
	200	205 210
gaa gaa act gaa gat gga att atg cat aat aag ttg ttt ttg gac tac		
788		
Glu Glu Thr Glu Asp Gly Ile Met His Asn Lys Leu Phe Leu Asp Tyr		
	215	220 225
acc ata aaa tgc tat gag agt ttt atg agt ggt gcc gac agc ttt gat		
836		
Thr Ile Lys Cys Tyr Glu Ser Phe Met Ser Gly Ala Asp Ser Phe Asp		
	230	235 240
gag atg aat gca gag ctg cag tca aaa ctg aag gat tta ttt aat gtg		
884		
Glu Met Asn Ala Glu Leu Gln Ser Lys Leu Lys Asp Leu Phe Asn Val		
245	250	255 260
gat gct ttt aag ctg gaa tca tta gaa gca aaa aac aga gca ttg aat		
932		
Asp Ala Phe Lys Leu Glu Ser Leu Glu Ala Lys Asn Arg Ala Leu Asn		
	265	270 275
gaa cag att gca aga ttg gaa caa gaa aga gaa aaa gaa ccg aat cgt		
980		
Glu Gln Ile Ala Arg Leu Glu Gln Glu Arg Glu Lys Glu Pro Asn Arg		
	280	285 290
cta gag tcg ttg aga aaa ctg aag gct tcc tta caa gga gat gtt caa		
1028		
Leu Glu Ser Leu Arg Lys Leu Lys Ala Ser Leu Gln Gly Asp Val Gln		
	295	300 305
aag tat cag gca tac atg agc aat ttg gag tct cat tca gcc att ctt		
1076		
Lys Tyr Gln Ala Tyr Met Ser Asn Leu Glu Ser His Ser Ala Ile Leu		
	310	315 320
gac cag aaa tta aat ggt ctc aat gag gaa att gct aga gta gaa cta		
1124		
Asp Gln Lys Leu Asn Gly Leu Asn Glu Glu Ile Ala Arg Val Glu Leu		

23

```

325          330          335          340
gaa tgt gaa aca ata aaa cag gag aac act cga cta cag aat atc att
1172
Glu Cys Glu Thr Ile Lys Gln Glu Asn Thr Arg Leu Gln Asn Ile Ile
          345          350          355

gac aac cag aag tac tca gtt gca gac att gag cga ata aat cat gaa
1220
Asp Asn Gln Lys Tyr Ser Val Ala Asp Ile Glu Arg Ile Asn His Glu
          360          365          370

aga aat gaa ttg cag cag act att aat aaa tta acc aag gac ctg gaa
1268
Arg Asn Glu Leu Gln Gln Thr Ile Asn Lys Leu Thr Lys Asp Leu Glu
          375          380          385

gct gaa caa cag aag ttg tgg aat gag gag tta aaa tat gcc aga ggc
1316
Ala Glu Gln Gln Lys Leu Trp Asn Glu Glu Leu Lys Tyr Ala Arg Gly
          390          395          400

aaa gaa gcg att gaa aca caa tta gca gag tat cac aaa ttg gct aga
1364
Lys Glu Ala Ile Glu Thr Gln Leu Ala Glu Tyr His Lys Leu Ala Arg
405          410          415          420

aaa tta aaa ctt att cct aaa ggt gct gag aat tcc aaa ggt tat gac
1412
Lys Leu Lys Leu Ile Pro Lys Gly Ala Glu Asn Ser Lys Gly Tyr Asp
          425          430          435

ttt gaa att aag ttt aat ccc gag gct ggt gcc aac tgc ctt gtc aaa
1460
Phe Glu Ile Lys Phe Asn Pro Glu Ala Gly Ala Asn Cys Leu Val Lys
          440          445          450

tac agg gct caa gtt tat gta cct ctt aag gaa ctc ctg aat gaa act
1508
Tyr Arg Ala Gln Val Tyr Val Pro Leu Lys Glu Leu Leu Asn Glu Thr
          455          460          465

gaa gaa gaa att aat aaa gcc cta aat aaa aaa atg ggt ttg gag gat
1556
Glu Glu Glu Ile Asn Lys Ala Leu Asn Lys Lys Met Gly Leu Glu Asp
          470          475          480

act tta gaa caa ttg aat gca atg ata aca gaa agc aag aga agt gtg
1604
Thr Leu Glu Gln Leu Asn Ala Met Ile Thr Glu Ser Lys Arg Ser Val
485          490          495          500

aga act ctg aaa gaa gaa gtt caa aag ctg gat gat ctt tac caa caa
1652
Arg Thr Leu Lys Glu Glu Val Gln Lys Leu Asp Asp Leu Tyr Gln Gln
          505          510          515

aaa att aag gaa gca gag gaa gag gat gaa aaa tgt gcc agt gag ctt
1700
Lys Ile Lys Glu Ala Glu Glu Glu Asp Glu Lys Cys Ala Ser Glu Leu

```

24

520 525 530
 gag tcc ttg gag aaa cac aag cac ctg cta gaa agt act gtt aac cag
 1748
 Glu Ser Leu Glu Lys His Lys His Leu Leu Glu Ser Thr Val Asn Gln
 535 540 545
 ggg ctc agt gaa gct atg aat gaa tta gat gct gtt cag cgg gaa tac
 1796
 Gly Leu Ser Glu Ala Met Asn Glu Leu Asp Ala Val Gln Arg Glu Tyr
 550 555 560
 caa cta gtt gtg caa acc acg act gaa gaa aga cga aaa gtg gga aat
 1844
 Gln Leu Val Val Gln Thr Thr Thr Glu Glu Arg Arg Lys Val Gly Asn
 565 570 575 580
 aac ttg caa cgt ctg tta gag atg gtt gct aca cat gtt ggg tct gta
 1892
 Asn Leu Gln Arg Leu Leu Glu Met Val Ala Thr His Val Gly Ser Val
 585 590 595
 gag aaa cat ctt gag gag cag att gct aaa gtt gat aga gaa tat gaa
 1940
 Glu Lys His Leu Glu Glu Gln Ile Ala Lys Val Asp Arg Glu Tyr Glu
 600 605 610
 gaa tgc atg tca gaa gat ctc tcg gaa aat att aaa gag att aga gat
 1988
 Glu Cys Met Ser Glu Asp Leu Ser Glu Asn Ile Lys Glu Ile Arg Asp
 615 620 625
 aag tat gag aag aaa gct act cta att aag tct tct gaa gaa tga
 2033
 Lys Tyr Glu Lys Lys Ala Thr Leu Ile Lys Ser Ser Glu Glu
 630 635 640
 agataaaatg ttgatcatgt atatatatcc atagtgaata aaattgtctc agtaaaaaaa
 2093
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa
 2150
 <210> 79
 <211> 642
 <212> BEJOK
 <213> Homo sapiens
 <400> 79
 Met Lys Arg Ser Ser Val Ser Ser Gly Gly Ala Gly Arg Leu Ser Met
 1 5 10 15
 Gln Glu Leu Arg Ser Gln Asp Val Asn Lys Gln Gly Leu Tyr Thr Pro
 20 25 30
 Gln Thr Lys Glu Lys Pro Thr Phe Gly Lys Leu Ser Ile Asn Lys Pro

25

35 40 45

Thr Ser Glu Arg Lys Val Ser Leu Phe Gly Lys Arg Thr Ser Gly His
50 55 60

Gly Ser Arg Asn Ser Gln Leu Gly Ile Phe Ser Ser Ser Glu Lys Ile
65 70 75 80

Lys Asp Pro Arg Pro Leu Asn Asp Lys Ala Phe Ile Gln Gln Cys Ile
85 90 95

Arg Gln Leu Cys Glu Phe Leu Thr Glu Asn Gly Tyr Ala His Asn Val
100 105 110

Ser Met Lys Ser Leu Gln Ala Pro Ser Val Lys Asp Phe Leu Lys Ile
115 120 125

Phe Thr Phe Leu Tyr Gly Phe Leu Cys Pro Ser Tyr Glu Leu Pro Asp
130 135 140

Thr Lys Phe Glu Glu Glu Val Pro Arg Ile Phe Lys Asp Leu Gly Tyr
145 150 155 160

Pro Phe Ala Leu Ser Lys Ser Ser Met Tyr Thr Val Gly Ala Pro His
165 170 175

Thr Trp Pro His Ile Val Ala Ala Leu Val Trp Leu Ile Asp Cys Ile
180 185 190

Lys Ile His Thr Ala Met Lys Glu Ser Ser Pro Leu Phe Asp Asp Gly
195 200 205

Gln Pro Trp Gly Glu Glu Thr Glu Asp Gly Ile Met His Asn Lys Leu
210 215 220

Phe Leu Asp Tyr Thr Ile Lys Cys Tyr Glu Ser Phe Met Ser Gly Ala
225 230 235 240

Asp Ser Phe Asp Glu Met Asn Ala Glu Leu Gln Ser Lys Leu Lys Asp
245 250 255

Leu Phe Asn Val Asp Ala Phe Lys Leu Glu Ser Leu Glu Ala Lys Asn
260 265 270

Arg Ala Leu Asn Glu Gln Ile Ala Arg Leu Glu Gln Glu Arg Glu Lys

26

275

280

285

Glu Pro Asn Arg Leu Glu Ser Leu Arg Lys Leu Lys Ala Ser Leu Gln
 290 295 300

Gly Asp Val Gln Lys Tyr Gln Ala Tyr Met Ser Asn Leu Glu Ser His
 305 310 315 320

Ser Ala Ile Leu Asp Gln Lys Leu Asn Gly Leu Asn Glu Glu Ile Ala
 325 330 335

Arg Val Glu Leu Glu Cys Glu Thr Ile Lys Gln Glu Asn Thr Arg Leu
 340 345 350

Gln Asn Ile Ile Asp Asn Gln Lys Tyr Ser Val Ala Asp Ile Glu Arg
 355 360 365

Ile Asn His Glu Arg Asn Glu Leu Gln Gln Thr Ile Asn Lys Leu Thr
 370 375 380

Lys Asp Leu Glu Ala Glu Gln Gln Lys Leu Trp Asn Glu Glu Leu Lys
 385 390 395 400

Tyr Ala Arg Gly Lys Glu Ala Ile Glu Thr Gln Leu Ala Glu Tyr His
 405 410 415

Lys Leu Ala Arg Lys Leu Lys Leu Ile Pro Lys Gly Ala Glu Asn Ser
 420 425 430

Lys Gly Tyr Asp Phe Glu Ile Lys Phe Asn Pro Glu Ala Gly Ala Asn
 435 440 445

Cys Leu Val Lys Tyr Arg Ala Gln Val Tyr Val Pro Leu Lys Glu Leu
 450 455 460

Leu Asn Glu Thr Glu Glu Glu Ile Asn Lys Ala Leu Asn Lys Lys Met
 465 470 475 480

Gly Leu Glu Asp Thr Leu Glu Gln Leu Asn Ala Met Ile Thr Glu Ser
 485 490 495

Lys Arg Ser Val Arg Thr Leu Lys Glu Glu Val Gln Lys Leu Asp Asp
 500 505 510

Leu Tyr Gln Gln Lys Ile Lys Glu Ala Glu Glu Glu Asp Glu Lys Cys

27

515 520 525

Ala Ser Glu Leu Glu Ser Leu Glu Lys His Lys His Leu Leu Glu Ser
530 535 540

Thr Val Asn Gln Gly Leu Ser Glu Ala Met Asn Glu Leu Asp Ala Val
545 550 555 560

Gln Arg Glu Tyr Gln Leu Val Val Gln Thr Thr Thr Glu Glu Arg Arg
565 570 575

Lys Val Gly Asn Asn Leu Gln Arg Leu Leu Glu Met Val Ala Thr His
580 585 590

Val Gly Ser Val Glu Lys His Leu Glu Glu Gln Ile Ala Lys Val Asp
595 600 605

Arg Glu Tyr Glu Glu Cys Met Ser Glu Asp Leu Ser Glu Asn Ile Lys
610 615 620

Glu Ile Arg Asp Lys Tyr Glu Lys Lys Ala Thr Leu Ile Lys Ser Ser
625 630 635 640

Glu Glu

<210> 80
<211> 22
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> праймер ПЦР для анализа TCR

<400> 80
gtctaccagg cattcgcttc at
22

<210> 81
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> праймер ПЦР для анализа TCR

<400> 81
tcagctggac cacagccgca gcgt
24

<210> 82
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> праймер ПЦР для анализа TCR

<400> 82
 tcagaaatcc tttctcttga c
 21

<210> 83
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> праймер ПЦР для анализа TCR

<400> 83
 ctagcctctg gaatcctttc tctt
 24

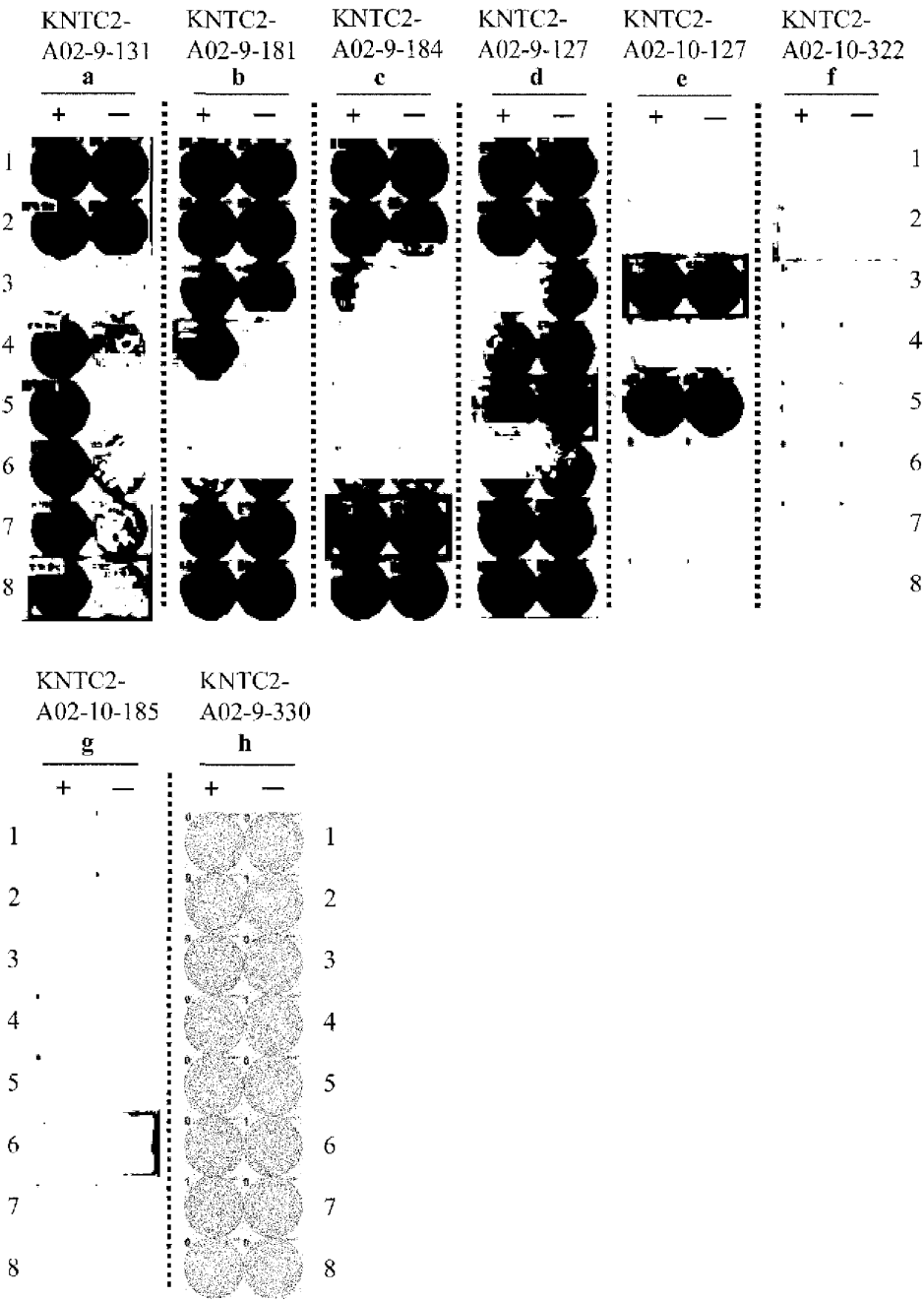
<210> 84
 <211> 4
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 84

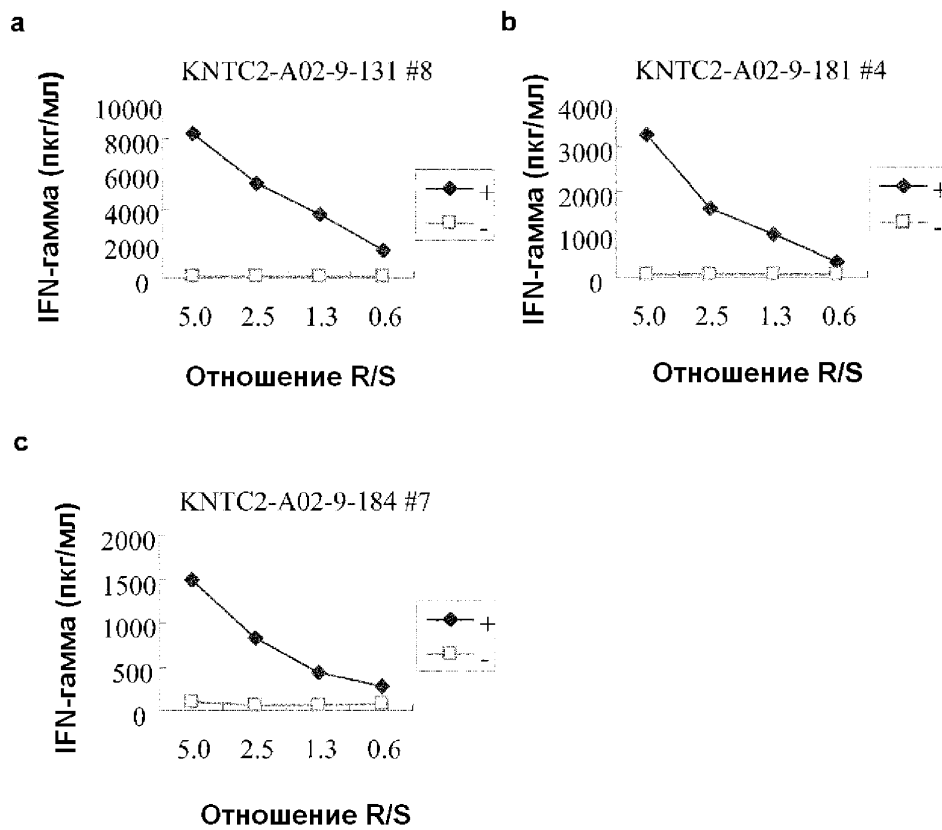
Asn Lys Arg Lys
 1

Фиг. 1



2/3

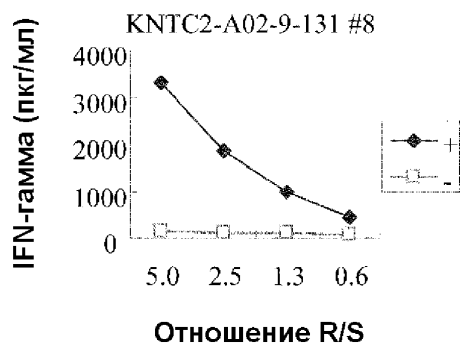
Фиг. 2



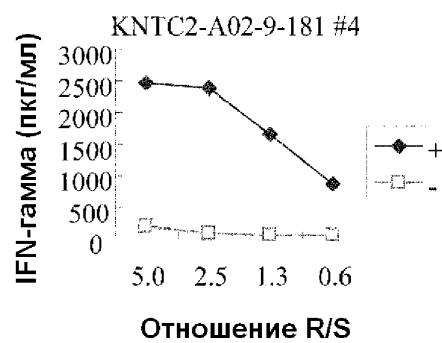
3/3

Фиг. 3

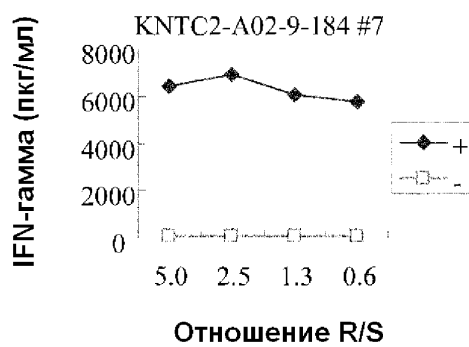
a



b



c



[Фиг. 4]

