



(51) МПК
C07K 7/06 (2006.01)
C12N 15/117 (2010.01)
C12N 5/078 (2010.01)
A61K 38/08 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011138160/10, 17.02.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
17.02.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
18.02.2009 US 61/153,408

(43) Дата публикации заявки: 27.03.2013 Бюл. № 9

(45) Опубликовано: 20.08.2015 Бюл. № 23

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 2004/100977 A1, 25.11.2004. US 5,861,278 A, 19.01.1999. LAOUKILI J. et al., "FoxM1: At the crossroads of ageing and cancer", Biochimica et Biophysica Acta, 2007 (available online 30 August 2006); 1775: 92"102. KIM I.-M. et al., "The Forkhead Box m1 Transcription Factor Stimulates the Proliferation of Tumor Cells during Development of Lung (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 19.09.2011

(86) Заявка РСТ:
JP 2010/001005 (17.02.2010)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2010/095428 (26.08.2010)Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 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)

RU 2560431 C2

RU 2560431 C2

(54) ПЕПТИДЫ FOXM1 И ВАКЦИНЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ИХ

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к области иммунологии. Предложен выделенный пептид, обладающий способностью индуцировать цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) в присутствии антигенпредставляющих клеток (АПК), несущих HLA-A*2402, и представляющий собой фрагмент белка FOXM1. Также рассмотрены: выделенный полинуклеотид, кодирующий пептид по изобретению; композиция

для индуцирования ЦТЛ и фармацевтическая композиция для лечения и/или профилактики рака, экспрессирующего FOXM1, и/или предупреждения его послеоперационных рецидивов, содержащие в качестве активного начала пептид по изобретению; способы индуцирования АПК и ЦТЛ; выделенная АПК со способностью индуцировать ЦТЛ; а также способ индуцирования иммунного ответа против

R U 2 5 6 0 4 3 1 C 2

рака, экспрессирующего FOXM1, у субъекта. Данное изобретение обеспечивает индуцирование иммунного ответа против клеток, экспрессирующих FOXM1, что может найти

дальнейшее применение в терапии различных заболеваний, в том числе злокачественных, связанных с повышенной экспрессией белка FOXM1. 8 н. и 3 з.п. ф-лы, 3 ил., 2 табл.

(56) (продолжение):

Cancer", *Cancer Res* 2006 (published online 17 February 2006); 66:2153-2161. KOMORI H. et al. "Identification of HLA-A2- or HLA-A24-Restricted CTL Epitopes Possibly Useful for Glypican-3-Specific Immunotherapy of Hepatocellular Carcinoma", *Clin Cancer Res*, 2006; 12: 2689-2697. АБЕЛЕВ Г.И., "Иммунология опухолей человека", Природа, 2000; 2:20-25

R U 2 5 6 0 4 3 1 C 2



(51) Int. Cl.
C07K 7/06 (2006.01)
C12N 15/117 (2010.01)
C12N 5/078 (2010.01)
A61K 38/08 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2011138160/10, 17.02.2010

(24) Effective date for property rights:
17.02.2010

Priority:

(30) Convention priority:
18.02.2009 US 61/153,408

(43) Application published: 27.03.2013 Bull. № 9

(45) Date of publication: 20.08.2015 Bull. № 23

(85) Commencement of national phase: 19.09.2011

(86) PCT application:
JP 2010/001005 (17.02.2010)(87) PCT publication:
WO 2010/095428 (26.08.2010)

Mail address:

129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, stroenie 3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij Partnery"(72) Inventor(s):
**TsUNODA Takuja (JP),
OSAVA Rjudzi (JP),
JOSIMURA Satiko (JP),
VATANABE Tomokhisa (JP)**(73) Proprietor(s):
ONKOTERAPI SAJENS, INK. (JP)

RU

2 5 6 0 4 3 1

C 2

(54) FOXM1 PEPTIDES AND VACCINES CONTAINING THEM

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceutics.

SUBSTANCE: present invention refers to immunology. What is presented is a recovered peptide having an ability to induce cytotoxic T-lymphocytes (CTL) in the presence of antigen-presenting cells (APS) carrying HLA-A*2402, and representing a fragment of FOXM1 protein. There are also disclosed: the recovered polynucleotide coding the peptide according to the invention; a composition for CTL induction and a pharmaceutical composition for treating and/or preventing cancer expressing FOXM1, and/or preventing its postoperative recurrences, containing the

peptide according to the invention as an agent; methods for APS and CTL induction; the recovered APS having an ability to induce CTL; as well as a method for inducing the immune response to cancer expressing FOXM1 in an individual.

EFFECT: invention provides inducing the immune response to cancer expressing FOXM1 that can find further application in therapy of various diseases, including malignant ones relates to higher expression of FOXM1 protein.

11 cl, 3 dwg, 2 tbl

RU 2 5 6 0 4 3 1 C 2

Область техники**Приоритет**

Настоящая заявка утверждает преимущество Предварительной заявки США №. 61/153408, поданной 18 февраля 2009 года, полное содержание которой включено в данное описание посредством ссылки.

Настоящее изобретение относится к области биологической науки, в частности, к области терапии онкологических заболеваний. В частности, настоящее изобретение относится к новым пептидам, которые чрезвычайно эффективны в качестве противораковых вакцин, и лекарственным средствам для лечения и предупреждения опухолей.

Предпосылки изобретения

Было показано, что CD8 положительные ЦТЛ узнают эпитопные пептиды, полученные из опухолеспецифических антигенов (ОCA), на молекуле класса I главного комплекса гистосовместимости (ГКГС), а затем уничтожают опухолевые клетки. С момента обнаружения семейства меланомных антигенов (MAGE) как первого примера ОCA при помощи иммунологических подходов были обнаружены многие другие ОCA (NPL 1: Boon T, Int J Cancer 1993 May 8, 54(2): 177-80; NPL 2: Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1996 Mar 1, 183(3): 725-9), и в настоящее время некоторые из ОCA находятся в процессе клинических исследований как иммунотерапевтические мишени.

Идентификация новых ОCA, которые индуцируют сильные и специфические противоопухолевые иммунные ответы, обеспечивает дальнейшее развитие клинического применения стратегии пептидных вакцинаций при различных типах рака (NPL 3: Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996 Oct 16, 88(20): 1442-55; NPL 4: Butterfield LH et al, Cancer Res 1999 Jul 1, 59(13): 3134-42; NPL 5: Vissers JL et al., Cancer Res 1999 Nov 1, 59(21): 5554-9; NPL 6: van der Burg SH et al., J Immunol 1996 May 1, 156(9): 3308-14; NPL 7: Tanaka F et al., Cancer Res 1997 Oct 15, 57(20): 4465-8; NPL 8: Fujie T et al., Int J Cancer 1999 Jan 18, 80(2): 169-72; NPL 9: Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 459-66; NPL 10: Oiso M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 387-94). До настоящего времени сообщалось о нескольких клинических испытаниях с использованием этих опухолеспецифических антигенов. К сожалению, до сих пор в этих испытаниях противораковых вакцин можно было наблюдать лишь низкие частоты реального ответа (NPL 11: Belli F et al., J Clin Oncol 2002 Oct 15, 20(20): 4169-80; NPL 12: Coulie PG et al., Immunol Rev 2002 Oct, 188: 33-42; NPL 13: Rosenberg SA et al., Nat Med 2004 Sep, 10(9): 909-15).

Подходящий ОCA необходим для пролиферации и выживания раковых клеток, как мишени для иммунотерапии, поскольку использование таких ОCA может свести к минимуму хорошо известный риск иммунного избежания раковых клеток, присущего удалению, мутированию или супрессии ОCA, как последствие проводимой в терапевтических целях иммунной селекции.

Список цитирования**Непатентная литература**

- [NPL 1] Boon T, bit J Cancer 1993 May 8, 54(2): 177-80;
- [NPL 2] Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1996 Mar 1, 183(3): 725-9;
- [NPL 3] Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996 Oct 16, 88(20): 1442-55;
- [NPL 4] Butterfield LH et al., Cancer Res 1999 Jul 1, 59(13): 3134-42;
- [NPL 5] Vissers JL et al., Cancer Res 1999 Nov 1, 59(21): 5554-9;
- [NPL 6] van der Burg SH et al., J Immunol 1996 May 1, 156(9): 3308-14;
- [NPL 7] Tanaka F et al., Cancer Res 1997 Oct 15, 57(20): 4465-8;
- [NPL 8] Fujie T et al., Int J Cancer 1999 Jan 18, 80(2): 169-72;

- [NPL 9] Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 459-66;
 [NPL 10] Oiso M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 387-94) ;
 [NPL 11] Belli F et al., J Clin Oncol 2002 Oct 15, 20(20): 4169-80;
 [NPL 12] Coulie PG et al., Immunol Rev 2002 Oct, 188: 33-42;
 5 [NPL 13] Rosenberg SA et al., Nat Med 2004 Sep, 10(9): 909-15).

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение основывается, в частности, на открытии подходящих мишней иммунотерапии. Поскольку ОСА обычно воспринимаются иммунной системы в качестве «своих» и, вследствие этого, зачастую не обладают иммуногенностью, открытие

- 10 соответствующих мишней является чрезвычайно важным. Как отмечалось выше, FOXM1 (SEQ ID NO: 34, кодируемая геном с GenBank Accession No. NM_202002.1 (SEQ ID NO: 33)) был идентифицирован как активируемый в раковых тканях, таких как острый миелоидный лейкоз (AML), рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, холангiocеллюлярный рак, хронический миелоидный лейкоз (CML),
 15 колоректальный рак, рак пищевода, рак желудка, рак желудка диффузного типа, рак печени, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), лимфома, остеосаркома, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечная карцинома, мелкоклеточный рак легкого (SCLC), опухоль мягких тканей и опухоль яичка. Таким образом, FOXM1 представляет собой подходящую мишень иммунотерапии.

- 20 Настоящее изобретение основывается, по меньшей мере, частично, на идентификации специфических эпитопных пептидов FOXM1, которые обладают способностью индуцировать цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ), специфические для FOXM1. Как подробно обсуждается ниже, мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), полученные от здоровых доноров, стимулировали при помощи HLA-A*2402-
 25 связывающихся подходящих пептидов, полученных из FOXM1. Затем были образованы линии ЦТЛ со специфической цитотоксичностью в отношении HLA-A24-положительных клеток-мишней, подвергнутых импульсному взаимодействию с каждым из подходящих пептидов. Данные результаты показывают, что эти пептиды представляют собой HLA-A24-рестрикованные эпитопные пептиды, которые могут индуцировать сильные и
 30 специфические иммунные ответы в отношении клеток, экспрессирующих FOXM1. Эти результаты показывают, что FOXM1 является сильным иммуногеном и его эпитопы представляют собой эффективные мишени для иммунотерапии опухолей.

- Соответственно, предметом настоящего изобретения является предоставление выделенных пептидов, связывающихся с HLA-антителом, которые представляют собой
 35 FOXM1 (SEQ ID NO: 34) или его фрагменты. Предполагается, что настоящие пептиды обладают способностью индуцировать ЦТЛ. Их можно использовать для индуцирования ЦТЛ *ex vivo* или можно вводить субъекту для индукции иммунного ответа против раков, таких как острый миелоцитарный лейкоз, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, холангiocеллюлярный рак, хронический миелоцитарный лейкоз,
 40 колоректальный рак, рак пищевода, рак желудка, рак желудка диффузного типа, рак печени, NSCLC, лимфома, остеосаркома, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечная карцинома, SCLC, опухоль мягких тканей и опухоль яичка. Предпочтительно, пептиды представляют собой нонапептиды или декапептиды, и более предпочтительно, состоят из последовательности аминокислот,
 45 выбранной из группы SEQ ID NO: 2, 7, 8, 16, 25, 30 и 31, демонстрирующих сильную способность индуцирования ЦТЛ.

Настоящее изобретение предусматривает модифицированные пептиды, обладающие аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, 7, 8, 16, 25, 30 и 31, где одна, две

или несколько аминокислот заменены или добавлены, при условии, что модифицированные пептиды сохраняют исходную способность индуцировать ЦТЛ.

Далее, настоящее изобретение предоставляет выделенные полинуклеотиды, кодирующие любой из пептидов по настоящему изобретению. Эти полинуклеотиды 5 можно использовать для индуцирования или подготовки антиген-экспрессирующих клеток (АПК) со способностью индуцировать ЦТЛ или можно вводить субъекту для индуцирования иммунного ответа против рака, а также для настоящих пептидов.

При введении субъекту настоящие пептиды представляются на поверхности АПК и 10 затем индуцируют ЦТЛ, нацеленные на соответствующие пептиды. Таким образом, аспектом настоящего изобретения является предоставление композиций или веществ, включая любые пептиды или полинуклеотиды по настоящему изобретению, для индуцирования ЦТЛ. Кроме того, композиции или вещества, включая любые из пептидов или полинуклеотидов, можно применять для лечения и/или предупреждения 15 онкологических заболеваний, таких как AML, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, холангiocеллюлярный рак, CML, колоректальный рак, рак пищевода, рак желудка, рак желудка диффузного типа, рак печени, NSCLC, лимфома, остеосаркома, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечная карцинома, мелкоклеточный рак легкого (SCLC), опухоль мягких тканей и опухоль яичка, и/или для предупреждения послеоперационных рецидивов этих. Таким 20 образом, еще одним предметом настоящего изобретения является предоставление фармацевтических композиций и веществ для лечения и/или для профилактики онкологических заболеваний, и/или для предупреждения их послеоперационных рецидивов, которые включают любой из пептидов или полинуклеотидов по настоящему изобретению. Вместо настоящих пептидов или полинуклеотидов или в дополнение к 25 настоящим пептидам или полинуклеотидам настоящие фармацевтические композиции или вещества могут включать, в качестве активных ингредиентов, АПК или экзосомы, которые представляют любой из настоящих пептидов.

Пептиды или полинуклеотиды по настоящему изобретению можно использовать 30 для индуцирования АПК, которые представляют на своей поверхности комплекс HLA-антитела и настоящего пептида, например, путем контактирования АПК, полученных от субъекта, с настоящим пептидом или введения полинуклеотида, кодирующего настоящий пептид, в АПК. Такие АПК обладают высокой способностью индуцировать ЦТЛ против пептидов-мишеней и пригодны для иммунотерапии рака. Таким образом, еще одним предметом настоящего изобретения является предоставление способов 35 индуцирования АПК, способных индуцировать ЦТЛ, а также АПК, полученных этими способами.

Еще одним предметом настоящего изобретения является предоставление способа индуцирования ЦТЛ, который включает стадию совместного культивирования CD8-положительных клеток с АПК или экзосомами, представляющими пептид по настоящему 40 изобретению на своей поверхности, или стадию введения гена, который включает полинуклеотид, кодирующий субъединицу Т-клеточного рецептора (ТКР), связывающийся с настоящим пептидом. ЦТЛ, получаемые настоящими способами, также находят применение при лечении и/или предупреждении раков, таких как AML, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, холангiocеллюлярный 45 рак, CML, колоректальный рак, рак пищевода, рак желудка, рак желудка диффузного типа, рак печени, NSCLC, лимфома, остеосаркома, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечная карцинома, мелкоклеточный рак легкого, опухоль мягких тканей и опухоль яичка. Таким образом, еще одним предметом

настоящего изобретения является предоставление ЦТЛ, получаемых настоящими способами.

Более того, еще одним предметом настоящего изобретения является предоставление способов индуцирования иммунного ответа против раков, которые включают в себя 5 способы введения веществ или композиций, содержащих FOXM1 или фрагменты этого, полинуклеотиды, кодирующих FOXM1 или фрагменты этого, или экзосомы или АПК, представляющие FOXM1 или фрагменты этого.

Настоящее изобретение можно применять к любому заболеванию, связанному со сверхэкспрессией FOXM1, включая рак, такой как AML, рак мочевого пузыря, рак 10 молочной железы, рак шейки матки, холангiocеллюлярный рак, CML, колоректальный рак, рак пищевода, рак желудка, рак желудка диффузного типа, рак печени, NSCLC, лимфома, остеосаркома, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечная карцинома, мелкоклеточный рак легкого, опухоль мягких тканей и опухоль яичка.

15 Следует понимать, что как предшествующее краткое описание настоящего изобретения, так и следующее ниже подробное описание представляют собой типичные варианты осуществления и не ограничивают настоящее изобретение или других альтернативных вариантов осуществления настоящего изобретения.

Краткое описание чертежей

20 Различные аспекты и приложения настоящего изобретения станут очевидными для любого специалиста в данной области после рассмотрения краткого описания фигур и подробного описания настоящего изобретения и его предпочтительных вариантов осуществления, которые следуют.

[фиг.1a-f] Фиг.1 показывает фотографии, демонстрирующие результаты интерферон-25 гамма ELISPOT-анализа на ЦТЛ, индуцированных пептидами, полученными из FOXM1. ЦТЛ в лунках с номерами #1, #4 и #7, стимулированные пептидами FOXM1-A24-9-262 (SEQ ID NO: 2) (a), #7 - FOXM1-A24-9-351(SEQ ID NO: 7) (b), #5 - FOXM1-A24-9-57(SEQ ID NO: 8) (c), #3 - FOXM1-A24-10-240(SEQ ID NO: 16) (d), #6 - FOXM1-A24-10-318(SEQ ID NO: 25) (e) и #4 - FOXM1-A24-10-390(SEQ ID NO:30) (f), продемонстрировали сильное 30 продуцирование интерферона-гамма по сравнению с контролем, соответственно.

[фиг. 1g-h] ЦТЛ в лунках с номерами #4 с FOXM 1-A24-10-238(SEQ ID NO:31) (g) продемонстрировали сильное продуцирование интерферона-гамма по сравнению с контролем, соответственно. Наоборот, в качестве типичного случая отрицательных данных, не было показано специфическое продуцирование интерферона-гамма от ЦТЛ, 35 стимулированных пептидом FOXM1-A24-9-316(SEQ ID NO: 1) против подвергнутых импульсному взаимодействию с пептидом клеток-мишеней (h). На фигурах, «+» указывает на продуцирование интерферона-гамма против клеток-мишеней, подвергнутых импульсному воздействию с соответствующим пептидом, и «-» указывает на продуцирование интерферона-гамма против клеток-мишеней, не подвергнутых 40 импульсному воздействию никаким пептидом. Площадь лунки этих изображений показывает, что клетки из соответствующих лунок были размножены, чтобы образовать линии ЦТЛ.

[фиг.2] Фигура 2 показывает линейные графики, демонстрирующие продуцирование интерферона-гамма линиями ЦТЛ, стимулированными пептидами FOXM1-A24-9-262 45 (SEQ ID NO: 2) (a), FOXM1-A24-10-240(SEQ ID NO: 16) (b), FOXM1-A24-10-318(SEQ ID NO: 25) (c) и FOXM1-A24-10-238(SEQ ID NO:31) (d), детектируемое при помощи интерферон-гамма ИФА-анализа. Она продемонстрировала, что линии ЦТЛ, образованные путем стимулирования каждым пептидом, показали сильное

5 продуцирование интерферона-гамма по сравнению с контролем. На фигурах, «+» указывает на продуцирование интерферона-гамма против клеток-мишеней, подвергнутых импульсному воздействию с соответствующим пептидом, и «-» указывает на продуцирование интерферона-гамма против клеток-мишеней, не подвергнутых

импульсному воздействию никаким пептидом.

10 [фиг.3] Фигура 3 демонстрирует продуцирование интерферона-гамма клонами ЦТЛ, образованными ограниченным разведением из линий ЦТЛ, стимулированных пептидами FOXM1-A24-9-262(SEQ ID NO: 2) (a), FOXM1-A24-10-240(SEQ ID NO: 16) (b) и FOXM1-

15 A24-10-238(SEQ ID NO: 31) (c). Она продемонстрировала, что линии ЦТЛ, образованные

10 путем стимулирования каждым пептидом, показали сильное продуцирование

15 интерферона-гамма по сравнению с контролем. На фигурах, «+» указывает на

10 продуцирование интерферона-гамма против клеток-мишеней, подвергнутых

импульсному воздействию с соответствующим пептидом, и «-» указывает на

15 продуцирование интерферона-гамма против клеток-мишеней, не подвергнутых

импульсному воздействию никаким пептидом.

10 [фиг.4] Фигура 4 показывает линейные графики, демонстрирующие специфическую ЦТЛ-активность в отношении клеток-мишеней, которые экзогенно экспрессируют FOXM1 и HLA-A*2402. Клетки COS7, трансфицированные HLA-A*2402 или

15 полноразмерным геном FOXM1, были подготовлены в качестве контроля. Клон ЦТЛ,

20 образованный с пептидом FOXM1-A24-9-262(SEQ ID NO: 2), демонстрировал

специфическую ЦТЛ-активность в отношении клеток COS7, трансфицированных как FOXM1, так и HLA-A*2402 (черный ромб). С другой стороны, не было зафиксировано

никакой значительной специфической ЦТЛ-активности в отношении клеток-мишеней,

экспрессирующих либо HLA-A*2402 (белый треугольник), либо FOXM1 (белый круг).

25 **Описание вариантов осуществления**

Несмотря на то что любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе, могут быть использованы в практике или тестировании вариантов осуществления настоящего изобретения, сейчас

описываются предпочтительные способы, приборы и материалы. При этом до описания

30 настоящих материалов и способов следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными размерами, формами, величинами, материалами, методиками, протоколами и т.п., описанными в данном документе, поскольку они

могут меняться в соответствии со стандартным экспериментированием и оптимизацией.

Следует также понимать, что терминология, используемая при описании, предназначена

35 лишь для целей описания конкретных версий или вариантов осуществления и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, который

ограничивается только прилагаемыми пунктами формулы изобретения.

Раскрытие каждой публикации, патента или заявки на патент, упомянутых в данном

описании, специально включено здесь посредством ссылки в полном объеме. При этом

40 ничего в настоящем документе не может быть истолковано в качестве признания того,

что настоящее изобретение не дает права датировать более ранним числом такое

раскрытие на основании изобретения или до изобретения.

В случае конфликта настоящее описание, включая определения, должно являться

45 определяющим. Кроме того, материалы, способы и примеры приведены только в

качестве иллюстрации и не предназначены для ограничения.

I. Определения

Формы единственного числа, как используется здесь, означают «по меньшей мере один», если иное специально не указано.

Термины «полипептид», «пептидные» и «белок» используются взаимозаменяемо в данном документе по отношению к полимеру из аминокислотных остатков. Термины относятся к аминокислотным полимерам, в которых один или несколько аминокислотных остатков представляет собой модифицированный остаток или не встречающийся в природе остаток, такой как искусственный химический миметик соответствующей аминокислоты естественного происхождения, а также к аминокислотным полимерам естественного происхождения.

Термин «аминокислоты», как используется здесь, относится к аминокислотам естественного происхождения и синтетическим аминокислотам, а также к аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые функционируют аналогично аминокислотам естественного происхождения. Аминокислоты естественного происхождения представляют собой аминокислоты, кодируемые генетическим кодом, а также аминокислоты, модифицированные после трансляции в клетках (например, гидроксипролин, гамма-карбоксиглутаминовая кислота, и О-фосфосерин). Выражение «аминокислотный аналог» относится к соединениям, которые обладают той же основной химической структурой (альфа-углеродный атом, связанный с водородом, карбоксильная группа, аминогруппа и R-группа), что и у аминокислоты естественного происхождения, но имеет модифицированную R-группу или модифицированный каркас (например, гомосерин, альфа-аминокапроновая кислота, метионин, сульфоксид, метионинметилсульфоний). Выражение «миметик аминокислоты» относится к химическим соединениям, которые имеют отличные структуры, но аналогичные с обычными аминокислотами функции.

Аминокислоты могут называться здесь по их широко известным трехбуквенным символам или однобуквенными символами, рекомендованными Биохимической номенклатурной комиссией IUPAC-IUB.

Термины «ген», «полинуклеотидов», «нуклеотиды» и «нуклеиновые кислоты» используются взаимозаменяемо здесь и, если специально не указано, сходно с аминокислотами называют по их общепринятым однобуквенным кодам.

Если не определено иначе, термин «рак» относится к ракам, сверхэкспрессирующим ген FOXM1, примеры которых включают, в качестве неограничивающих примеров, AML, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, холангиоцеллюлярный рак, CML, колоректальный рак, рак пищевода, рак желудка, рак желудка диффузного типа, рак печени, NSCLC, лимфома, остеосаркома, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечная карцинома, мелкоклеточный рак легкого, опухоль мягких тканей и опухоль яичка.

Если не определено иначе, термины «цитотоксический Т-лимфоцит», «цитотоксическая Т-клетка» и «ЦТЛ» используются взаимозаменяемо здесь, и, если иное специально не указано, относятся к подгруппе Т-лимфоцитов, которые способны распознавать «не свои» клетки (например, опухолевые клетки, инфицированные вирусом клетки) и индуцировать гибель таких клеток.

Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют такой же смысл, как это обычно понимается любым специалистом в области, к которой относится настоящее изобретение.

II. Пептиды

Для демонстрации того, что пептиды, полученные из FOXM1, действуют в качестве антигенов, узнаваемых ЦТЛ, пептиды, полученные из FOXM1 (SEQ ID NO: 34) анализировали для определения того, представляли ли они собой антигенные эпитопы, рестриктированные по HLA-A24, которые представляют собой часто встречающиеся

аллели HLA (Date Y et al., *Tissue Antigens* 47: 93-101, 1996; Kondo A et al., *J Immunol* 155: 4307-12, 1995; Kubo RT et al., *J Immunol* 152: 3913-24, 1994).

HLA-A24-связывающие подходящие пептиды, полученные из FOXM1, определяли по их аффинности связывания с HLA-A24. Следующие пептиды представляют собой

5 подходящие пептиды:

FOXM1-A24-9-316 (SEQ ID NO: 1),
FOXM1-A24-9-262 (SEQ ID NO: 2),
FOXM1-A24-9-451 (SEQ ID NO: 3),
10 FOXM1-A24-9-455 (SEQ ID NO: 4),
FOXM1-A24-9-483 (SEQ ID NO: 5),
FOXM1-A24-9-443 (SEQ ID NO: 6),
FOXM1-A24-9-351 (SEQ ID NO: 7),
15 FOXM1-A24-9-57 (SEQ ID NO: 8),
FOXM1-A24-9-133 (SEQ ID NO: 9),
FOXM1-A24-9-754 (SEQ ID NO: 10),
FOXM1-A24-9-429 (SEQ ID NO: 11),
FOXM1-A24-9-436 (SEQ ID NO: 12),
20 FOXM1-A24-9-524 (SEQ ID NO: 13),
FOXM1-A24-9-241 (SEQ ID NO: 14),
FOXM1-A24-10-627 (SEQ ID NO: 15),
FOXM1-A24-10-240 (SEQ ID NO: 16),
25 FOXM1-A24-10-777 (SEQ ID NO: 17),
FOXM1-A24-10-453 (SEQ ID NO: 18),
FOXM1-A24-10-382 (SEQ ID NO: 19),
FOXM1-A24-10-483 (SEQ ID NO: 20),
30 FOXM1-A24-10-435 (SEQ ID NO: 21),
FOXM1-A24-10-396 (SEQ ID NO: 22),
FOXM1-A24-10-325 (SEQ ID NO: 23),
FOXM1-A24-10-443 (SEQ ID NO: 24),
FOXM1-A24-10-318 (SEQ ID NO: 25),
35 FOXM1-A24-10-713 (SEQ ID NO: 26),
FOXM1-A24-10-513 (SEQ ID NO: 27),
FOXM1-A24-10-7 (SEQ ID NO: 28),
FOXM1-A24-10-376 (SEQ ID NO: 29),
40 FOXM1-A24-10-390 (SEQ ID NO: 30),
FOXM1-A24-10-238 (SEQ ID NO: 31), и
FOXM1-A24-10-264 (SEQ ID NO: 32).

После стимуляции Т-клеток *in vitro* дендритными клетками (ДК), нагруженными

45 этими пептидами, были успешно образованы ЦТЛ с использованием каждого из

следующих пептидов:

FOXM1-A24-9-262 (SEQ ID NO: 2),
 FOXM1-A24-9-351 (SEQ ID NO: 7),
 FOXM1-A24-9-57 (SEQ ID NO: 8),
₅ FOXM1-A24-10-240 (SEQ ID NO: 16),
 FOXM1-A24-10-318 (SEQ ID NO: 25),
 FOXM1-A24-10-390 (SEQ ID NO: 30), и
 FOXM1-A24-10-238 (SEQ ID NO: 31).

₁₀ Эти образованные ЦТЛ демонстрируют сильную специфическую ЦТЛ-активность в отношении клеток-мишней, подвергавшихся импульсному взаимодействию с соответствующими пептидами. Эти результаты показывают, что FOXM1 представляет собой антиген, узнающийся ЦТЛ, и что проверенные пептиды являются эпитопными пептидами FOXM1, рестриктированными по HLA-A24.

₁₅ Поскольку ген FOXM1 сверхэкспрессируется в раковых клетках, таких как AML, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, холангиоцеллюлярный рак, CML, колоректальный рак, рак пищевода, рак желудка, рак желудка диффузного типа, рак печени, NSCLC, лимфома, остеосаркома, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечная карцинома, мелкоклеточный рак легкого, опухоль мягких тканей и опухоль яичка, и не экспрессируется в большинстве ₂₀ нормальных органов, он представляет собой хорошую мишень для иммунотерапии. Таким образом, настоящее изобретение предоставляет нанопептиды (пептиды, состоящие из девяти аминокислотных остатков), и декапептиды (пептиды, состоящие из десяти аминокислотных остатков), соответствующие ЦТЛ-распознаваемым эпитопам FOXM1. Альтернативно, настоящее изобретение предоставляет выделенный пептид, ₂₅ который связывается с HLA-антигеном и индуцирует цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ), где пептид состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34 или является ее иммунологически активным фрагментом. Предпочтительные примеры нанопептидов и декапептидов по настоящему изобретению включают те пептиды, ₃₀ которые состоят из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 2, 7, 8, 16, 25, 30 и 31.

В большинстве случаев можно использовать программы из системы программного обеспечения, доступные, например, в Интернете, такие как программы, описанные в in Parker KC et al, J Immunol 1994 Jan 1, 152(1): 163-75, Buus et al. (Tissue Antigens., 62:378-84, 2003) и Nielsen et al. (Protein Sci, 12:1007-17, 2003, Bioinformatics, 20(9): 1388-97, 2004), ₃₅ для расчета аффинностей связывания между различными пептидами и HLA-антигенами *in silico*. Аффинность связывания с HLA-антигенами можно определять, как описано, например, в ссылках на Parker KC et al., J Immunol 1994 Jan 1, 152(1): 163-75; и Kuzushima K et al., Blood 2001, 98(6): 1872-81. Способы определения аффинности связывания описаны, например, в: Journal of Immunological Methods, 1995, 185: 181-190; Protein Science, ₄₀ 2000, 9: 1838-1846. Вследствие этого с помощью таких программ из системы программного обеспечения можно выбрать фрагменты, полученные из FOXM1, которые обладают высокой аффинностью связывания с HLA-антигенами. Таким образом, настоящее изобретение охватывает пептиды, состоящие из любых фрагментов, полученные из FOXM1, которые связываются с HLA-антигенами, выявленными с ₄₅ помощью таких известных программ. Пептидом по настоящему изобретению может являться пептид, состоящий из полноразмерного FOXM1.

Пептиды по настоящему изобретению могут быть фланкированы дополнительными аминокислотными остатками, при условии, что получающийся пептид сохраняет свою

способность индуцировать ЦТЛ. Аминокислотные остатки, фланкирующие настоящие пептиды, могут состоять из любых видов аминокислот, при условии, что они не влияют на способность исходного пептида индуцировать ЦТЛ. Таким образом, настоящее изобретение охватывает пептиды, которые включают в себя пептиды, полученные из 5 FOXM1, и обладают аффинностью связывания с HLA-антителами. В основном такие пептиды меньше, чем около 40 аминокислот, часто меньше, чем около 20 аминокислот, и обычно меньше, чем около 15 аминокислот.

В большинстве случаев, модификация одного, двух или нескольких аминокислот в пептиде не будет влиять на функцию пептида, а в некоторых случаях будет даже 10 усиливать нужную функцию исходного пептида. В самом деле, модифицированные пептиды (т.е., пептиды, состоящие из последовательности аминокислот, в которой один, два или несколько аминокислотных остатков были модифицированы (т.е., заменены, удалены, добавлены или встроены по сравнению с исходной контрольный последовательностью), как известно, сохраняют биологическую активность исходного 15 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 варианте осуществления пептиды по настоящему изобретению могут обладать как способностью индуцировать ЦТЛ, так и аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 2, 7, 8, 16, 25, 30 и 20 31, где добавлена, встроена и/или заменена одна, две или даже несколько аминокислот.

Специалисты в данной области признают, что отдельные добавления или замены в аминокислотной последовательности, которые изменяют одну аминокислоту или небольшой процент аминокислот, имеют тенденцию к сохранению свойств боковой цепи исходной аминокислоты. Как таковые, их часто называют «консервативными 25 заменами», или «консервативными модификациями», при которых изменение белка дает в результате модифицированный белок, имеющих функции, аналогичные функциям исходного белка. В рассматриваемой области известны списки консервативных замен, обеспечивающих функционально сходные аминокислоты. Примеры особенностей боковых цепей аминокислот, желательных для консервативности, включают, например, 30 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, имеющие следующие общие функциональные группы или характеристики: алифатическая боковая цепь (G, A, V, L, I, P); боковая цепь, содержащая гидроксильную группу (S, T, Y); боковая цепь, содержащая атом серы (C, M); боковая цепь, содержащая карбоновую кислоту и амид 35 (D, N, E, Q); боковая цепь, содержащая основание (R, K, H); и боковая цепь, содержащая ароматическую группу (H, F, Y, W). Кроме того, каждая из следующих восьми групп содержит аминокислоты, которые в рассматриваемой области принимаются в качестве консервативных замен друг для 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).

Такие консервативно модифицированные пептиды рассматриваются также как пептиды по настоящему изобретению. При этом пептиды по настоящему изобретению не ограничиваются этим и могут включать неконсервативные модификации, при условии,

что модифицированный пептид сохраняет способность индуцировать ЦТЛ исходного пептида. Более того, модифицированные пептиды не должны исключать ЦТЛ-индуцирующих пептидов полиморфных вариантов, межвидовых гомологов и аллелей FOXM1.

5 Для сохранения необходимой способности индуцировать ЦТЛ можно изменять (вставлять, удалять, добавлять и/или заменять) небольшое число (например, 1, 2 или несколько) или небольшой процент аминокислот. В настоящем документе термин «несколько» означает 5 или меньше аминокислот, например, 4, 3 или меньше. Доля аминокислот, подлежащих модификации, составляет предпочтительно 20% или 10% меньше, более предпочтительно 15% или меньше, даже более предпочтительно 10% или меньше, или от 1% до 5%.

Более того, в пептидах по настоящему изобретению можно встраивать, замещать или добавлять аминокислотные остатки, или аминокислотные остатки можно удалять для обеспечения более высокой аффинности связывания. При использовании в контексте 15 иммунотерапии, настоящие пептиды должны быть представлены на поверхности клетки или экзосомы, предпочтительно в качестве комплекса с HLA-антителом. В дополнение к пептидам, которые обнаруживаются в природе, поскольку закономерность последовательностей пептидов, обнаруживаемых путем связывания с HLA-антителами, уже известна (J Immunol 1994 года, 152: 3913; Immunogenetics 1995, 41: 178; J Immunol 20 1994 г., 155: 4307), модификации, основанные на такой закономерности, можно вводить в иммуногенные пептиды по настоящему изобретению. Например, для увеличения HLA-A24-связывания может быть желательна замена второй с N-конца аминокислоты фенилаланином, тирозином, метионином или триптофаном, и/или аминокислоты на С-конце фенилаланином, лейцином, изолейцином, триптофаном или метионином. Таким 25 образом, пептиды, имеющие аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 7, 8, 16, 25, 30 и 31, где вторая аминокислота с N-конца аминокислотной последовательности SEQ ID NO заменяется фенилаланином, тирозином, метионином или триптофаном, и пептидами, и/или где С-конец аминокислотной последовательности SEQ ID NO заменяется фенилаланином, лейцином, 30 изолейцином, триптофаном или метионином, охватываются настоящим изобретением.

Настоящее изобретение также рассматривает добавление одной, двух или нескольких аминокислот с N- и/или С-конца описанных пептидов. Такие модифицированные пептиды, обладающие высокой аффинностью связывания с HLA-антителом и сохранившие способность индуцировать ЦТЛ, также включены в настоящее изобретение.

35 При этом в случае, когда пептидная последовательность идентична части аминокислотной последовательности эндогенного или экзогенного белка, имеющего отличные функции, могут индуцироваться побочные эффекты, такие как аутоиммунные расстройства и/или аллергические симптомы по отношению к определенным веществам. Поэтому предпочтительно сначала провести поиски гомологов с использованием 40 имеющихся баз данных, чтобы избежать ситуации, при которой последовательность пептида соответствует аминокислотной последовательности другого белка. В случае, когда из поисков гомологов становится ясно, что не существует пептида даже с отличиями в 1 или 2 аминокислоты по сравнению с реальным пептидом, реальный пептид можно изменить в целях повышения его аффинности связывания с HLA-антителами, и/или 45 увеличения его способности индуцировать ЦТЛ без какой-либо опасности таких побочных эффектов.

Несмотря на то что ожидается, что пептиды, обладающие высокой аффинностью связывания с HLA-антителами, как описано выше, будут очень эффективными,

подходящие пептиды, которые выбирают в зависимости от наличия высокой аффинности связывания в качестве индикатора, дополнительно проверяют на наличие способности индуцировать ЦТЛ. В настоящем документе выражение «способность индуцировать ЦТЛ» указывает на способность пептида индуцировать ЦТЛ, в случае представленности

5 на антигенпредставляющих клетках (АПК). Кроме того, «способность индуцировать ЦТЛ» включает в себя способность пептида индуцировать активацию ЦТЛ, пролиферацию ЦТЛ, способствовать ЦТЛ-лизису клеток-мишеней и увеличивать продукцию гамма-интерферона ЦТЛ.

Подтверждение способности индуцировать ЦТЛ достигается путем индуцирования

10 АПК, несущих ГКГС-антитела человека (например, В-лимфоцитов, макрофагов и дендритных клеток (ДК)), или, более конкретно, ДК, полученных из мононуклеарных лейкоцитов периферической крови человека, и после стимуляции пептидами, смешивания с CD8-положительными клетками, а затем измерения гамма-интерферона, продуцированного и высвобожденного цитотоксическими Т-лимфоцитами против

15 клеток-мишеней. В качестве реакционной системы можно использовать трансгенных животных, которые были выведены для экспрессии HLA-антитела человека (например, те, которые описаны в BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auge C, Low L, Primus J, Diamond DJ, Hum Immunol 2000 Aug, 61(8): 764-79, родственные статьи, книги Linkout Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA A*0201/DRI transgenic mice:

20 dependence on HLA class II restricted T(H) response. Например, клетки-мишени можно метить радиоактивным изотопом ^{51}Cr и подобным, и цитотоксическую активность можно рассчитать по радиоактивности, высвобожденной из клетки-мишени.

Альтернативно, способность индуцировать ЦТЛ можно оценивать путем определения гамма-интерферона, продуцированного и высвобожденного ЦТЛ в присутствии АПК, 25 которые несут иммобилизованные пептиды, и визуализации зоны ингибирования на среде с помощью моноклональных антител против IFN-гамма.

Как результат проверки способности пептидов индуцировать ЦТЛ, как описано выше, было обнаружено, что нонапептиды или декапептиды, выбранные из пептидов, состоящих из аминокислотных последовательностей, показанных SEQ ID NO: 2, 7, 8, 30 16, 25, 30 и 31, демонстрировали чрезвычайно высокую способность индуцировать ЦТЛ, а также высокую аффинность связывания с HLA-антителом. Таким образом, эти пептиды являются примером предпочтительного варианта осуществления настоящего изобретения.

Более того, результаты анализа гомологий показали, что эти пептиды не имеют 35 значительной гомологии с пептидами, полученными от любых других известных генных продуктов человека. Это снижает возможность неизвестных или нежелательных иммунных реакций в случае применения для иммунотерапии. В силу вышесказанного, и с этой точки зрения эти пептиды находят применение для вызывания иммунитета против FOXM1 у больных раком. Итак, пептиды по настоящему изобретению, 40 предпочтительно, пептиды, состоящие из последовательности аминокислот, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 7, 8, 16, 25, 30 и 31.

В дополнение к модификации настоящих пептидов, рассмотренных выше, описанные пептиды дополнительно могут быть связаны с другими веществами, при условии, что они сохраняют способность индуцировать ЦТЛ исходного пептида. К типичным 45 веществам относятся: белки, пептиды, липиды, сахара и цепи сахаров, ацетильные группы, природные и синтетические полимеры и др. Настоящие пептиды могут содержать модификации, такие как гликозилирование, окисление боковой цепи и/или фосфорилирование; при условии, что модификации не уничтожают биологическую

активность исходного пептида. Такие типы модификаций могут придавать дополнительные функции (например, функции мишени и функции доставки) и/или стабилизировать пептиды.

Например, для увеличения стабильности полипептида *in vivo*, как известно в 5 рассматриваемой области, вводятся D-аминокислоты, миметики аминокислоты или аминокислоты, отсутствующие в природе; эта концепция также может быть принята для настоящих полипептидов. Стабильность полипептида можно определить рядом способов. Например, для проверки стабильности можно использовать пептидазы и 10 различные биологические среды, такие как сыворотка и плазма крови человека (смотри, например, Verhoef et al., Eur J Drug Metab Pharmacokin 1986, 11: 291-302).

Более того, как отмечалось выше, среди модифицированных пептидов, которые 15 подвергались заменам, удалениям или добавлениям одного, двух или нескольких аминокислотных остатков, можно проводить скрининг или отбирать пептиды, обладающие той же или более высокой активностью по сравнению с исходными пептидами. Вследствие этого настоящее изобретение также предоставляет способ скрининга и отбора модифицированных пептидов, обладающих той же или более 20 высокой активностью по сравнению с исходными. Например, способ может включать в себя стадии:

- а: замена, удаление или добавление, по меньшей мере, одного аминокислотного остатка у пептида по настоящему изобретению; 20
- б: определение активности указанного пептида;;
- с: отбор пептида, обладающего той же или более высокой активностью по сравнению с исходным.

Здесь, пептиды по настоящему изобретению также могут описываться как «пептид 25 (ы) FOXM1» или «полипептид(ы) FOXM1».

III. Подготовка пептидов FOXM1

Пептиды по настоящему изобретению можно подготовить с использованием известных способов. Например, пептиды можно подготовить синтетически, с помощью 30 технологии рекомбинантных ДНК или химического синтеза. Пептиды по настоящему изобретению можно синтезировать по отдельности или в качестве больших полипептидов, состоящих из двух или нескольких пептидов. Затем пептиды можно выделить, т.е. очистить или отделить так, чтобы в существенной степени освободить от других природных белков клеток-хозяев и их фрагментов, или каких-либо других химических веществ.

Пептиды по настоящему изобретению могут содержать модификации, как, например, 35 гликозилирование, окисление боковой цепи и фосфорилирование, при условии, что модификации не уничтожают биологической активности пептидов, как описано в настоящем документе. Другие модификации включают встраивание D-аминокислот или других аминокислотных миметиков, которые можно использовать, например, для 40 увеличения времени полужизни пептидов в сыворотке крови.

Пептид по настоящему изобретению можно получить путем химического синтеза на основе выбранной последовательности аминокислот. Примеры традиционных способов пептидного синтеза, которые можно применить для синтеза, включают, в качестве неограничивающих примеров, следующие:

- (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;
- 5 (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
- 10 (vii) Barany G. & Merrifield R.B., Peptides Vol. 2, "Solid Phase Peptide Synthesis", Academic Press, New York, 1980, 100-118.

Альтернативно, настоящие пептиды можно получить, применяя любые известные генно-инженерные способы для получения пептидов (например, Morrison J, J Bacteriology 1977, 132: 349-51; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (eds. Wu et al.) 1983, 101: 15 347-62). Например, во-первых, подготавливают подходящий вектор, несущий полинуклеотид, кодирующий реальный пептид в экспрессируемой форме (например, ниже регуляторной последовательности, соответствующей промоторной последовательности), и трансформируют соответствующую клетку хозяина. Клетку хозяина затем культивируют для продуцирования представляющего интерес пептида.

20 Пептид также можно продуцировать *in vitro*, применяя систему трансляции *in vitro*.

IV. Полинуклеотиды

Настоящее изобретение также предоставляет полинуклеотиды, которые кодируют любые из вышеупомянутых пептидов по настоящему изобретению. Они включают полинуклеотиды, полученные из гена FOXM1 природного происхождения (GenBank 25 Accession No. NM_202002.1 (SEQ ID NO: 33)), а также полинуклеотиды, имеющие их консервативно модифицированные нуклеотидные последовательности. Здесь выражение «консервативно модифицированная нуклеотидная последовательность» относится к последовательностям, которые кодируют идентичные или по существу идентичные аминокислотные последовательности. Из-за вырожденности генетического кода 30 большое количество функционально идентичных нуклеиновых кислот кодирует любой заданный белок. Например, каждый из кодонов GCA, GCC, GCG и GCU кодирует аминокислоту аланин. Таким образом, в каждом положении, где аланин точно определяется кодоном, кодон может быть изменен на любой из соответствующих кодонов, записанных без модификации кодированного полипептида. Такие варианты 35 нуклеиновых кислот представляют собой «молчащие варианты», которые являются одним из видов консервативно модифицированных вариантов. Каждая последовательность нуклеиновых кислот в настоящем документе, которая кодирует пептид, также характеризует каждый возможный молчащий вариант нуклеиновой кислоты. Любой специалист в рассматриваемой области признает, что каждый кодон 40 в нуклеиновой кислоте (за исключением AUG, который обычно является единственным кодоном для метионина, и TGG, который обычно является единственным кодоном для триптофана) можно изменить для получения функционально идентичной молекулы. Соответственно, каждый молчащий вариант нуклеиновой кислоты, которая кодирует пептид, в неявном виде описывается в каждой раскрытой последовательности.

45 Полинуклеотид по настоящему изобретению может состоять из ДНК, РНК и их производных. Как известно в рассматриваемой области, молекула ДНК состоит из оснований, таких как основания естественного происхождения А, Т, С, Г, и Т заменяется на У в РНК. Любой специалист признает, что основания, не встречающиеся в природе,

равным образом включаются в полинуклеотиды.

Полинуклеотид по настоящему изобретению может кодировать несколько пептидов по настоящему изобретению с присутствием встраиваемых аминокислотных последовательностей или без таковых. Например, встраиваемая аминокислотная

- 5 последовательность может обеспечивать участок расщепления (например, последовательность распознавания ферментом) полинуклеотида или транслированных пептидов. Более того, полинуклеотид может включать любые дополнительные последовательности для кодирующего последовательности, кодирующей пептид по настоящему изобретению. Например, полинуклеотид может представлять собой 10 рекомбинантный полинуклеотид, который включает регуляторные последовательности, необходимые для экспрессии пептида, или может представлять собой экспрессионный вектор (плазмиду) с маркерными генами и т.д. В большинстве случаев, такие рекомбинантные полинуклеотиды можно подготовить путем манипуляции с полинуклеотидами с помощью обычных рекомбинантных способов, используя, 15 например, полимеразы и эндонуклеазы.

Для получения полинуклеотидов по настоящему изобретению можно применять способы как рекомбинантного, так и химического синтеза. Например, полинуклеотид можно получить путем встраивания в соответствующий вектор, который может экспрессироваться при трансфекции в компетентные клетки. Альтернативно,

- 20 полинуклеотид можно амплифицировать с помощью методик ПЦР или экспрессии в соответствующих хозяевах (смотри, например, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989). Кроме того, полинуклеотид можно синтезировать с использованием твердофазных способов, как описано в Beaucage SL & Iyer RP, Tetrahedron 1992, 48: 2223-311; Matthes et al., EMBO J 25 1984, 3: 801-5.

V. Экзосомы

Настоящее изобретение дополнительно предоставляет внутриклеточные везикулы, называемые экзосомами, которые представляют комплексы, образуемые между пептидами по настоящему изобретению и HLA-антителами на их поверхности. Экзосомы

- 30 можно подготовить, например, с помощью способов, подробно изложенных в патентной заявке Японии Kohyo Publications Nos. Hei 11-510507 и WO99/03499, и можно подготовить с использованием АПК, полученных от пациентов, которые подвергаются лечению и/или профилактике. Экзосомы по настоящему изобретению можно прививать в качестве вакцины, подобно пептидам по настоящему изобретению.

- 35 Тип HLA-антител, содержащихся в комплексах, должен соответствовать таковому у субъектов, требующих лечения и/или профилактики. Например, среди японского населения широко распространен HLA-A24 (в частности, A*2402) и, следовательно, он являлся бы подходящим для лечения японского пациента. Использование типа A24, который высоко экспрессируется среди японцев и европейцев, является благоприятным 40 для получения эффективных результатов. Как правило, в клинике тип HLA-антитела пациента, требующего лечения, исследуют заранее, что дает возможность соответствующей селекции пептидов, имеющих высокий уровень аффинности связывания с определенным антигеном, или имеющих способность индуцировать ЦТЛ путем представления антигена. Кроме того, в целях получения пептидов, обладающих как 45 высоким уровнем аффинности связывания, так и способностью индуцировать ЦТЛ, можно выполнять замену, вставку и/или добавление 1, 2, или нескольких аминокислот на основе аминокислотной последовательности частичного пептида природного FOXM1.

При использовании HLA-антител типа A24 для экзосомы по настоящему

изобретению находят применение пептиды, имеющие последовательность любой из SEQ ID NO: 2, 7, 8, 16, 25, 30 и 31.

VI. Антигенпредставляющие клетки (АПК)

Настоящее изобретение также предоставляет выделенные АПК, которые

5 представляют комплексы, образованные на их поверхности между HLA-антигенами и пептидами по настоящему изобретению. АПК можно получать от пациентов, которые подвергаются лечению и/или профилактике, и можно вводить в качестве вакцины сами по себе или в комбинации с другими лекарствами, включая пептиды по настоящему изобретению, экзосомы или ЦТЛ.

10 АПК не ограничиваются определенным видом клеток и включают ДК, клетки Лангерганса, макрофаги, лимфоциты и активированные Т-клетки, которые, как известно, представляют белковоподобные антигены на своей клеточной поверхности так, чтобы они узнавались лимфоцитами. Поскольку ДК являются представляющими АПК, которые обладают наилучшим индуцирующим действием на ЦТЛ среди АПК, ДК находят 15 применение в качестве АПК по настоящему изобретению.

Например, АПК по настоящему изобретению можно получить путем индуцирования ДК из моноцитов периферической крови и затем контактирования (стимулирования) их с пептидами по настоящему изобретению *in vitro* и *ex vivo* и *in vivo*. Когда пептиды по настоящему изобретению вводят субъектам, АПК, которые представляют пептиды 20 по настоящему изобретению, индуцируются в организме субъекта. Таким образом, АПК по настоящему изобретению можно получить путем сбора АПК от субъекта после введения пептидов по настоящему изобретению субъекту. Кроме того, АПК по настоящему изобретению можно получить путем контактирования АПК, полученных от субъекта, с пептидом по настоящему изобретению.

25 АПК по настоящему изобретению можно вводить субъекту отдельно или в комбинации с другими лекарственными средствами, включая пептиды, экзосомы или ЦТЛ по настоящему изобретению, для индукции у субъекта иммунного ответа против рака. Например, введение *ex vivo* может включать стадии:

- 30 а: сбор АПК от первого субъекта,
- б: контактирование АПК со стадии а) с пептидом и
- с: введение АПК со стадии б) второму субъекту.

Первый субъект и второй субъект могут являться одним и тем же индивидуумом, или это могут быть разные индивидуумы. АПК, полученные на стадии б, могут применяться в качестве вакцины для лечения и/или предупреждения рака, в том числе 35 АМЛ, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, холангиоцеллюлярный рак, CML, колоректальный рак, рак пищевода, рак желудка, рак желудка диффузного типа, рак печени, NSCLC, лимфома, остеосаркома, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечная карцинома, мелкоклеточный рак легкого (SCLC), опухоль мягких тканей и опухоль яичка.

40 Настоящее изобретение также предоставляет способ или процесс для производства фармацевтической композиции, индуцирующей АПК, где способ включает стадию примешивания или составления рецептуры пептида по настоящему изобретению с фармацевтически приемлемым носителем.

В соответствии с аспектом настоящего изобретения, АПК имеют высокий уровень 45 способности индуцирования ЦТЛ. В термине «высокий уровень способности индуцировать ЦТЛ», высокий уровень относится к уровню таковой для АПК, не контактирующей с пептидом или контактирующей с пептидами, которые не могут индуцировать ЦТЛ. Такие АПК, имеющие высокий уровень способности индуцировать

ЦТЛ, можно подготовить при помощи способа, который включает стадию передачи полинуклеотида, кодирующего пептид по настоящему изобретению, к АПК в условиях *in vitro*, а также способов, упомянутых выше. Введенные гены могут быть в виде ДНК или РНК. Примеры способов введения включают, без особых ограничений, различные способы, традиционно выполняемые в этой области, такие как липофекция, 5 электропорация и кальцийфосфатный способ. А именно, это можно выполнить, как описано в Cancer Res 1996, 56: 5672-7; J Immunol 1998, 161: 5607-13; J Exp Med 1996, 184: 465-72; Опубликованный японский перевод международных публикаций №. 2000-509281. После переноса гена в АПК ген претерпевает в клетке транскрипцию, 10 трансляцию и т.д., а затем полученный белок процессируется ГКГС Класса I или Класса II, и проходит через путь представления до представленных пептидов.

VII. Цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ)

ЦТЛ, индуцированный против любого из пептидов по настоящему изобретению, усиливает иммунную реакцию в отношении раковых клеток *in vivo* и, таким образом, 15 может быть использован подобно пептидам как таковым. Таким образом, настоящее изобретение также предоставляет выделенные ЦТЛ, которые специфически индуцируются или активируются при помощи любого из настоящих пептидов.

Такие ЦТЛ можно получить путем (1) введения пептида(ов) по настоящему изобретению субъекту, сбора ЦТЛ от субъекта; или (2) контактирования 20 (стимулирования) полученных от субъекта АПК, и CD8-положительных клеток или мононуклеарных лейкоцитов периферической крови *in vitro* с пептидом(ами) по настоящему изобретению, а затем выделения ЦТЛ; или (3) контактирования CD8-положительных клеток или мононуклеарных лейкоцитов периферической крови *in vitro* с АПК или экзосомами, представляющими комплекс HLA-антител и настоящего 25 пептида на своей поверхности и последующего выявления ЦТЛ; или (4) введения гена, включающего полинуклеотид, кодирующий субъединицу Т-клеточного рецептора (ТКР), связывающийся с пептидом по настоящему изобретению, для ЦТЛ. Вышеупомянутые АПК и экзосомы можно подготовить с помощью способов, 30 описанных выше, и способ (4) подробно описан ниже в разделе «VIII. Т-клеточный рецептор (ТКР)».

ЦТЛ по настоящему изобретению можно получать от пациентов, которые подвергаются лечению и/или профилактике, и можно вводить сами по себе или в комбинации с другими лекарственными средствами, в том числе пептидами по настоящему изобретению или экзосомами с целью регулирования воздействий. 35 Полученные ЦТЛ действуют конкретно в отношении клеток-мишеней, представляющих пептиды по настоящему изобретению, например, те же пептиды, что использовались для индукции. Клетки-мишени могут представлять собой клетки, которые эндогенно экспрессируют FOXM1, такие как раковые клетки или клетки, трансфицированные геном FOXM1, и клетки, которые представляют пептид по настоящему изобретению 40 на поверхности клеток за счет стимуляции пептидом, также могут служить в качестве мишени для атаки активированных ЦТЛ.

VIII. Т-клеточный рецептор (ТКР)

Настоящее изобретение также предоставляет композицию, содержащую нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды, которые способны образовывать субъединицы 45 Т-клеточного рецептора (ТКР), и способы ее применения. Субъединицы ТКР обладают способностью образовывать ТКР, которые придают специфичность Т-клеткам в отношении опухолевых клеток, экспрессирующих FOXM1. С помощью известных в данной области способов можно идентифицировать нуклеиновые кислоты альфа- и

бета- цепей, как ТКР-субъединиц ЦТЛ, индуцированных одним или несколькими пептидами по настоящему изобретению (WO2007/032255 и Morgan et al., J Immunol, 171, 3288 (2003)). Например, способ ПЦР является предпочтительным для анализа ТКР. ПЦР-праймеры для анализа могут представлять собой, например, праймеры 5'-R (5'-gtctaccaggcattcgcttc-3') в качестве праймеров с 5'-стороны (SEQ ID NO: 35) и праймеры 3'-Тра-С (5'-tcagctggaccacagccgacgt-3'), специфические для С-области альфа-цепи ТКР (SEQ ID NO: 36), праймеры 3-Pra-Cl (5'-tcagaaatcccttcgttgc-3'), специфические для С1-области бета-цепи ТКР (SEQ ID NO: 37) или праймеры 3-TRbeta-C2 (5'-ctagcctctgaaatcccttcgtt-3'), специфические для С2-области бета-цепи ТКР (SEQ ID NO: 38), 5 в качестве праймеров с 3'-стороны, но без ограничения. Производные ТКР могут с высокой авидностью связывать клетки-мишени, представляющие пептид FOXM1, и необязательно опосредовать эффективное уничтожение клеток-мишней, 10 представляющих пептида FOXM1 *in vivo* и *in vitro*.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие субъединицы ТКР, могут быть включены в 15 соответствующие векторы, например ретровирусные векторы. Эти векторы хорошо известны в рассматриваемой области. Нуклеиновые кислоты или векторы, содержащие их, можно эффективно передавать в Т-клетки, например в Т-клетки пациента. Предпочтительно, настоящее изобретение предоставляет готовую к использованию 20 композицию, дающую возможность быстрой модификации собственных Т-клеток пациента (или таковых другого млекопитающего) для того, чтобы быстро и легко продуцировать модифицированные Т-клетки, имеющие превосходные свойства уничтожать раковые клетки.

Специфический ТКР представляет собой рецептор, способный специфически 25 распознавать комплекс пептида по настоящему изобретению и молекулы HLA, придающий Т-клетке специфическую активность по отношению к клетке-мишени в случае, когда ТКР находится на поверхности Т-клетки. Специфическое распознавание вышеупомянутого комплекса можно подтвердить любыми известными способами, и 30 предпочтительные способы включают, например, тетramerный анализ с использованием молекулы HLA и пептида по настоящему изобретению, и анализ ELISPOT. Проведением анализа ELISPOT можно подтвердить, что Т-клетка, экспрессирующая ТКР на клеточной 35 поверхности, распознает клетки с помощью ТКР и что сигнал передается внутриклеточно. Подтверждение того, что вышеупомянутый комплекс может придавать Т-клеточную цитотоксическую активность в случае, когда комплекс существует на Т-клеточной поверхности, можно также получить при помощи известного способа. 40 Предпочтительный способ включает, например, определение цитотоксической активности против HLA-положительной клетки-мишени, такой как анализ высвобождения хрома.

Кроме того, настоящее изобретение представляет ЦТЛ, которые подготавливают 45 путем передачи нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды ТКР-субъединиц, которые связываются с пептидом FOXM1, например, SEQ ID NO: 2, 7, 8, 16, 25, 30 и 31, в контексте HLA-A24. Трансдуцированные ЦТЛ способны направляться к раковым клеткам *in vivo*, и могут быть наращены при помощи известных способов культивирования *in vitro* (смотри, Kawakami et al., J Immunol., 142, 3452-3461 (1989)). ЦТЛ по настоящему изобретению можно применять для образования иммуногенной композиции, полезной при лечении или профилактике рака у пациента, нуждающегося 45 в терапии и защите (WO2006/031221).

IX. Фармацевтические вещества или композиции

Предупреждение и профилактика включает любую активность, которая уменьшает

бремя смертности или процент смертности от заболевания. Предупреждение и профилактика может осуществляться «на первичном, вторичном и третичном уровнях предупреждения». В то время как первичные предупреждение и профилактика предотвращают развитие заболевания, вторичный и третичный уровни предупреждения и профилактики включают мероприятия, направленные на предупреждение и профилактику прогрессирования заболевания и появления симптомов, а также ослабления негативного воздействия уже существующего заболевания путем восстановления функций и уменьшения связанных с заболеванием осложнений. Кроме того, предупреждение и профилактика включают в себя широкий спектр

5 профилактических терапий, направленных на смягчение тяжести конкретного расстройства, например, снижение распространения и метастазирования опухолей, уменьшение ангиогенеза. Лечение и/или профилактика рака или, и/или предупреждения их послеоперационных рецидивов включает в себя любую из следующих стадий, как, например, хирургическое удаление раковой клетки, подавление роста раковых клеток,

10 инволюция или регрессия опухоли, индукция ремиссии и подавление возникновения рака, регрессия опухоли и уменьшение или подавление метастазов. Эффективное лечение и/или профилактика рака уменьшает смертность и улучшает прогноз для индивидуумов, имеющих рак, снижает уровень онкомаркеров в крови, ослабляет обнаруживаемые симптомы, сопровождающие рак. Например, снижение или улучшение симптомов,

15 20 составляющие эффективное лечение и/или предупреждение, включают 10%, 20%, 30% и более уменьшение, или стабилизацию заболевания.

Поскольку экспрессия FOXM1 специфически увеличена в раках, включая AML, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, холангиоцеллюлярный рак, CML, колоректальный рак, рак пищевода, рак желудка, рак желудка диффузного типа, рак печени, NSCLC, лимфома, остеосаркома, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечная карцинома, мелкоклеточный рак легкого, опухоль мягких тканей и опухоль яичка, по сравнению с нормальной тканью, пептиды по настоящему изобретению или полинуклеотиды, кодирующие такие пептиды, можно применять для лечения и/или профилактики рака и опухоли, и/или предупреждения их 25 послеоперационных рецидивов. Таким образом, настоящее изобретение предоставляет лекарственное вещество или композицию для лечения и/или профилактики рака или опухоли, и/или предупреждения их послеоперационных рецидивов, которое включает один или несколько пептидов по настоящему изобретению, или полинуклеотиды, кодирующие пептиды в качестве активного ингредиента. Альтернативно, настоящие 30 35 пептиды можно экспрессировать на поверхности любой из вышеупомянутых экзосом или клеток, таких как АПК, для использования в лекарственных веществах или композициях. Кроме того, вышеупомянутые ЦТЛ, которые нацеливают любой из пептидов по настоящему изобретению, также можно использовать в качестве активного ингредиента настоящих лекарственных веществ или композиций.

40 В другом варианте осуществления, настоящее изобретение также предоставляет применение активного ингредиента, выбранного из:

- (a) пептида по настоящему изобретению;
- (b) нуклеиновой кислоты, кодирующей такой пептид, как раскрыто здесь, в экспрессируемой форме;
- (c) АРС или экзосомы, представляющей пептид по настоящему изобретению на своей 45 поверхности; и
- (d) цитотоксической Т-клетки по настоящему изобретению в производстве фармацевтической композиции или вещества для лечения рака или

опухоли.

Альтернативно, настоящее изобретение дополнительно предоставляет активный ингредиент, выбранный из:

(а) пептида по настоящему изобретению;

5 (б) нуклеиновой кислоты, кодирующей такой пептид, как раскрыто здесь, в экспрессируемой форме;

(с) АРС или экзосомы, представляющей пептид по настоящему изобретению на своей 10 поверхности; и

(д) цитотоксической Т-клетки по настоящему изобретению

10 для применения при лечении рака или опухоли.

Альтернативно, настоящее изобретение дополнительно предоставляет способ или процесс для изготовления фармацевтической композиции или вещества для лечения рака или опухоли, где способ или процесс включает стадию составления рецептуры фармацевтически или физиологически приемлемого носителя с активным ингредиентом, 15 выбранным из:

(а) пептида по настоящему изобретению;

(б) нуклеиновой кислоты, кодирующей такой пептид, как раскрыто здесь, в экспрессируемой форме;

(с) АРС или экзосомы, представляющей пептид по настоящему изобретению на своей 20 поверхности; и

(д) цитотоксической Т-клетки по настоящему изобретению в качестве активных ингредиентов.

В другом варианте осуществления, настоящее изобретение также предоставляет способ или процесс для изготовления фармацевтической композиции или вещества для 25 лечения рака или опухоли, где способ или процесс включает стадии примешивания активного ингредиента с фармацевтически или физиологически приемлемым носителем, где активный ингредиент выбирают из:

(а) пептида по настоящему изобретению;

(б) нуклеиновой кислоты, кодирующей такой пептид, как раскрыто здесь, в

30 экспрессируемой форме;

(с) АРС или экзосомы, представляющей пептид по настоящему изобретению на своей поверхности; и

(д) цитотоксической Т-клетки по настоящему изобретению.

Альтернативно, фармацевтическую композицию или вещество или настоящее

35 изобретение может применять либо для профилактики рака или опухоли, либо для предупреждения их послеоперационных рецидивов, либо и для того и другого.

Настоящие фармацевтические вещества или композиции находят применение в качестве вакцины. В контексте настоящего изобретения выражение «вакцина» (также именуемая как «иммуногенная композиция») относится к веществу, которое имеет 40 функцию индуцирования противоопухолевого иммунитета после прививки животным.

Фармацевтические вещества или композиции по настоящему изобретению можно применять для лечения и/или предупреждения раков и опухолей, и/или предупреждения их послеоперационных рецидивов у субъектов или пациентов, включая человека и любых других млекопитающих, включая, в качестве неограничивающих примеров, 45 мышь, крысу, морскую свинку, кролика, кошку, собаку, овцу, козу, свинью, крупный рогатый скот, лошадь, обезьяну, бабуина и шимпанзе, в частности, коммерчески важных животных или домашних животных.

В соответствии с настоящим изобретением оказалось, что пептиды, обладающие

любой аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 2, 7, 8, 16, 25, 30 и 31, представляют собой HLA- A24-рестрикованные эпитопные пептиды или подходящие пептиды, которые могут индуцировать сильный и специфический иммунный ответ. Вследствие этого настоящие фармацевтические вещества или композиции, которые

5 включают любые из этих пептидов, обладающих аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 2, 7, 8, 16, 25, 30 и 31, особенно подходят для введения субъектам, чей HLA-антитело представляет собой HLA-A24. То же относится и к фармацевтическим веществам и композициям, которые включают полинуклеотиды, кодирующие любой из этих пептидов (т.е., полинуклеотиды по настоящему

10 изобретению).

Раки или опухоли, подлежащие лечению фармацевтическими веществами или композициями по настоящему изобретению, не ограничены и включают любой рак или опухоль, в который вовлечен FOXM1 (например, сверхэкспрессируется), включая, например, AML, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, 15 холангиоцеллюлярный рак, CML, колоректальный рак, рак пищевода, рак желудка, рак желудка диффузного типа, рак печени, NSCLC, лимфома, остеосаркома, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечная карцинома, мелкоклеточный рак легкого, опухоль мягких тканей и опухоль яичка.

Настоящие фармацевтические вещества или композиции могут содержать, в

20 дополнение к вышеупомянутым активным ингредиентам, другие пептиды, которые обладают способностью индуцировать ЦТЛ против раковых клеток, другие полинуклеотиды, кодирующие другие пептиды, другие клетки, которые представляют другие пептиды, или подобное. Здесь, другие пептиды, которые обладают способностью индуцировать ЦТЛ против раковых клеток, служат примером специфических антигенов 25 рака (например, идентифицированные ОСА), но не ограничиваются этим.

Если необходимо, фармацевтические вещества или композиции по настоящему изобретению могут дополнительно включать другие терапевтические вещества в качестве активного ингредиента, при условии, что вещество не ингибитирует противоопухолевый эффект активного ингредиента, например, любой из настоящих 30 пептидов. Например, составы могут включать противовоспалительные вещества, обезболивающие, вещества для химиотерапии и подобное. Дополнительно к включению других терапевтических веществ в лекарственное средство как таковое, лекарственные средства по настоящему изобретению можно также применять последовательно или одновременно с одной или несколькими другими фармакологическими веществами.

35 Количество лекарственного средства и фармакологического вещества зависят, например, от типа применяемого фармакологического вещества(в), подлежащего лечению заболевания и графика и способов введения.

Следует понимать, что в дополнение к ингредиентам, подробно упомянутым здесь, фармацевтические вещества или композиции по настоящему изобретению могут 40 включать и другие композиции, общепринятые в данной области, с учетом типа рассматриваемого состава.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, настоящие фармацевтические вещества или композиции могут быть включены в готовые изделия и комплекты, содержащие материалы, полезные для лечения патологических состояний 45 подлежащего лечению заболевания, например, рака. Готовое изделие может включать контейнер любого из настоящих фармацевтических веществ или композиций, с этикеткой. Соответствующие контейнеры включают бутылки, флаконы и пробирки. Контейнеры могут быть образованы из различных материалов, таких как стекло или пластик.

Надпись на контейнере должна указывать, что композиция применяется для лечения или предупреждения одного или нескольких состояний заболевания. Этикетки могут также содержать предписание по введению и так далее.

В дополнение к контейнеру, описанному выше, комплект, включающий

5 фармацевтическую субстанцию или композицию по настоящему изобретению, может необязательно дополнительно включать второй контейнер, размещающий фармацевтически приемлемый разбавитель. Он также может включать другие материалы, желательные с коммерческой точки зрения и с точки зрения пользователя, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши с инструкцией 10 по применению.

Фармацевтические вещества или композиции, при желании, могут быть представлены в упаковке или дозаторном устройстве, которое может содержать одну или несколько единичных лекарственных форм, содержащих активный ингредиент. Упаковка может, например, включать металлическую или пластиковую фольгу, такую как блистерная 15 упаковка. Упаковка или дозаторное устройство может сопровождаться инструкциями для введения.

(1) Фармацевтические вещества или композиции, содержащие пептиды в качестве активного ингредиента

Пептиды по настоящему изобретению можно вводить непосредственно в качестве 20 фармацевтического вещества или композиции, или, при необходимости, чтобы были составлены путем общепринятых способов подбора составов. В последнем случае, в дополнение к пептидам по настоящему изобретению, носители, наполнители и подобное, которые обычно используются для лекарств, могут быть включены как соответствующие без особых ограничений. Примерами таких носителей являются стерилизованная вода, 25 физиологический раствор, фосфатный буфер, культуральная жидкость и подобное. Более того, фармацевтические вещества или композиции могут при необходимости содержать стабилизаторы, сус펜зии, консерванты, сурфактанты и подобное.

Фармацевтические вещества или композиции по настоящему изобретению можно применять для противоопухолевых назначений.

30 Для индуцирования ЦТЛ *in vivo* пептиды по настоящему изобретению можно подготовить в виде комбинации, состоящей из двух или нескольких пептидов по настоящему изобретению. Пептидная комбинация может иметь форму смеси или может соединяться друг с другом с помощью стандартных методик. Например, пептиды могут быть химически связаны или экспрессированы в качестве единой слитой полипептидной 35 последовательности. Пептиды в комбинации могут быть одинаковыми или различными. Благодаря введению пептидов по настоящему изобретению пептиды с высокой плотностью представляются при помощи HLA-антител на АПК, затем индуцируются ЦТЛ, которые специфически реагируют на комплекс, образовавшийся между 40 представленным пептидом и HLA-антителом. Альтернативно, АПК (например, ДК) отбирают у субъектов, а затем стимулируют пептидами по настоящему изобретению для получения АПК, которые представляют любой из пептидов по этому изобретению на своей клеточной поверхности. Эти АПК повторно вводят субъектам для индуцирования ЦТЛ у субъектов, и, как следствие, агрессивность по отношению к опухолеспецифическому эндотелию может увеличиться.

45 Фармацевтические вещества или композиции для лечения и/или предупреждения рака или опухоли, которые включают пептида по настоящему изобретению в качестве активного ингредиента, также может включать адьювант для, как известно, эффективного индуцирования клеточного иммунитета. Альтернативно,

фармацевтические вещества или композиции можно вводить с другими активными ингредиентами или вводить при помощи составов в гранулах. Адьювант относится к соединению, которое усиливает иммунный ответ против белка при введении одновременно (или последовательно) с белком, обладающим иммунологической

5 активностью. Адьюванты, рассматриваемые здесь, включают те, которые описаны в литературе (Clin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89). Примеры подходящих адьювантов включают фосфат алюминия, гидроокись алюминия, квасцы, холерный токсин, токсин сальмонеллы и подобные, но не ограничиваются этим.

Более того, можно удобно использовать липосомные составы, гранулированные 10 составы, в которых пептид связывается с бусами диаметром несколько микрометров, и составы, в которых липид связывается с пептидом.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, пептиды по настоящему изобретению можно также вводить в виде фармацевтически приемлемой соли.

Предпочтительные примеры солей включают соли щелочных металлов, соли металлов, 15 соли на органической основе, соли органических кислот и соли неорганических кислот.

В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические вещества или композиции по настоящему изобретению могут дополнительно включать компонент, который 20 праймирует ЦТЛ. Липиды были определены в качестве веществ, способных праймировать ЦТЛ *in vivo* в отношении вирусных антигенов. Например, остатки

пальмитиновой кислоты можно присоединять к эпсилон- и альфа- аминогруппе остатка лизина, а затем присоединять к пептиду по настоящему изобретению. Липидированный пептид затем можно либо вводить непосредственно в мицеллу или частицу, включенную 25 в липосому, либо эмульгировать в адьюванте. В качестве другого примера липидного праймирования ЦТЛ ответов, липопротеины *E. coli*, такие как, например,

трипальмитоил-S-глицерилцистеинил-серил-серин (P3CSS) можно использовать для 30 праймирования ЦТЛ в случае ковалентного присоединения к соответствующему пептиду (смотри, например, Deres et al., Nature 1989, 342: 561-4).

Способ введения может быть оральным, внутрикожным, под кожным, внутривенной 35 инъекцией или подобным, и находит применение системное введение или местное введение поблизости от участков-мишеней. Введение можно осуществлять посредством единичного введения или поддерживать с помощью нескольких введений. Дозу пептидов по настоящему изобретению можно соответствующим образом корректировать в зависимости от подлежащего лечению заболевания, возраста пациента, массы, способа введения и подобного, и она обычно составляет от 0,001 мг до 1000 мг, например, от 40 0,001 мг до 1000 мг, например, от 0,1 мг до 10 мг, и может вводиться от одного раза в несколько дней до одного раза в несколько месяцев. Любой специалист в рассматриваемой области может соответствующим образом подобрать подходящую дозу.

(2) Фармацевтические вещества или композиции, содержащие полинуклеотиды в 45 качестве активного ингредиента

Фармацевтические вещества или композиции по настоящему изобретению также могут содержать нуклеиновые кислоты, кодирующие описанные здесь пептиды в экспрессируемой форме. Здесь, выражение «в экспрессируемой форме» означает, что полинуклеотид в случае введения в клетку будет экспрессироваться *in vivo*, в качестве 45 полипептида, который индуцирует противоопухолевый иммунитет. В типичном варианте осуществления, последовательности нуклеиновых кислот представляющего интерес полинуклеотида включает регуляторные элементы, необходимые для экспрессии полинуклеотида. Полинуклеотид(ы) можно приспособить таким образом, чтобы

получить стабильную вставку в геном клетки-мишени (смотри, например, Thomas KR & Capecchi MR, *Cell* 1987, 51: 503-12 для описания векторов с кассетами для гомологичной рекомбинации). Смотри, например, Wolff et al., *Science* 1990, 247: 1465-8; Патент США No. 5580859; 5589466; 5804566; 5739118; 5736524; 5679647; и WO 98/04720. Примеры

5 технологий доставки на основе ДНК включают «голую ДНК», облегченную (бутивакайн, полимеры, пептид-опосредованная) доставку, катионные липидные комплексы, и опосредованную частицами («генной пушки») или опосредованную давлением доставку (смотри, например, Патент США No 5922687).

Пептиды по настоящему изобретению можно экспрессировать при помощи вирусных 10 или бактериальных векторов. Примеры экспрессионных векторов включают ослабленных вирусных хозяев, таких как вакцинного вируса или вируса чумы птиц. Этот подход предполагает использование вакцинного вируса, например, в качестве вектора для экспрессии нуклеотидных последовательностей, кодирующих пептид. После 15 введения в хозяина рекомбинантный вакцинный вирус экспрессирует иммуногенный пептид, и, посредством этого, вызывает иммунный ответ. Вакцинны векторы и способы пригодны для протоколов иммунизации, как описано, например, в патенте США No 4722848. Другим вектором является БЦЖ (бацилла Кальметта-Герена). Векторы БЦЖ описаны в Stover et al., *Nature* 1991, 351: 456-60. Наблюдается широкое разнообразие 20 других векторов, пригодных для терапевтического введения или иммунизации, например, аденоовирусные и связанные с аденоовирусными векторами, ретровирусные векторы, векторы *Salmonella typhi*, векторы на основе обезвреженного сибириязвенного токсина и подобные. Смотри, например, See, e.g., Shata et al., *MoI 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.

Доставка полинуклеотида в организме субъекта может являться либо 25 непосредственной, и в этом случае субъект непосредственно подвергается действию вектора, несущего полинуклеотид, или опосредованной, в случае чего клетки сначала трансформируют представляющим интерес полинуклеотидом *in vitro*, а затем клетки трансплантируют субъекту. Эти два подхода известны, соответственно, как генные терапии *in vivo* и *ex vivo*.

30 Для общего обзора способов генной терапии, смотри Goldspiel et al., *Clinical Pharmacy* 1993, 12: 488-505; Wu и 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, широко известные в области технологии рекомбинантной ДНК, которые также могут быть использованы 35 для настоящего изобретения, описаны в Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY, 1993; и Krieger, *Gene Transfer и Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY, 1990.

Способ введения может быть оральным, внутрикожным, под кожным, внутривенной 40 инъекцией или подобным, и находит применение системное введение или местное введение поблизости от участков-мишени. Введение можно осуществлять посредством единичного введения или поддерживать с помощью нескольких введений. Дозу пептидов по настоящему изобретению можно соответствующим образом корректировать в зависимости от подлежащего лечению заболевания, возраста пациента, массы, способа 45 введения и подобного, и она обычно составляет от 0,001 мг до 1000 мг, например, от 0,001 мг до 1000 мг, например, от 0,1 мг до 10 мг, и может вводиться от одного раза в несколько дней до одного раза в несколько месяцев. Любой специалист в рассматриваемой области может соответствующим образом подобрать подходящую дозу.

Х. Способы применения пептидов, экзосом, АПК и ЦТЛ

Пептиды и полинуклеотиды по настоящему изобретению можно использовать для индуцирования АПК и ЦТЛ. Экзосомы и АПК по настоящему изобретению также можно использовать для индуцирования ЦТЛ. Пептиды, полинуклеотиды, экзосомы

и АПК можно использовать в комбинации с любыми другими соединениями, при условии, что соединения не ингибируют их способность индуцирования ЦТЛ. Таким образом, любое из вышеупомянутых фармацевтических веществ или композиций по настоящему изобретению можно применять для индуцирования ЦТЛ, и дополнительно к этому, те, которые включают пептиды и полинуклеотиды, можно также применять для индуцирования АПК, как обсуждается и описывается ниже.

(1) Способ индуцирования антиген-представляющих клеток (АПК)

Настоящее изобретение предоставляет способы индуцирования или подготовки АПК с высокой способностью индуцировать ЦТЛ при помощи пептидов или полинуклеотидов по настоящему изобретению. Способы по настоящему изобретению включают стадию контактирования АПК с пептидами по настоящему изобретению *in vitro* и *ex vivo* и *in vivo*. Например, способ контактирования АПК с пептидами *ex vivo* могут включать стадии:

а: сбор АПК от субъекта:, и

б: контактирование АПК со стадии а) с пептидом.

АПК не ограничиваются определенным видом клеток и включают ДК, клетки Лангерганса, макрофаги, В-клетки и активированные Т-клетки, которые, как известно, представляют белковоподобные антигены на своей клеточной поверхности так, чтобы они узнавались лимфоцитами. ДК могут предпочтительно использоваться из-за их самой сильной среди АПК способности индуцировать ЦТЛ. Любые пептиды по настоящему изобретению можно использовать в качестве пептида со стадии б самого по себе или в комбинации с другими пептидами по настоящему изобретению.

Альтернативно, пептиды по настоящему изобретению можно вводить субъекту для контактирования пептидов с АПК *in vivo*. В результате в организме субъекта можно индуцировать АПК с высокой способностью индуцировать ЦТЛ. Таким образом, в настоящее изобретение также рассматривает способ введения пептидов по настоящему изобретению субъекту для индуцирования АПК *in vivo*. Также возможно введение субъекту полинуклеотидов, кодирующих пептиды по настоящему изобретению, в экспрессируемой форме, так, чтобы пептиды по настоящему изобретению экспрессировались и контактировали с АПК *in vivo* для индуцирования вследствие этого АПК с высокой способностью индуцировать ЦТЛ в организме субъекта. Таким образом настоящее изобретение также предусматривает способ введения полинуклеотидов по настоящему изобретению субъекту для индуцирования АПК *in vivo*. Выражение «экспрессируемая форма» определено выше, в разделе «IX. Фармацевтические вещества или композиции».

(2) Фармацевтические вещества или композиции, содержащие полинуклеотиды в качестве активного ингредиента.

Более того, настоящее изобретение включает введение полинуклеотида по настоящему изобретению в АПК для индуцирования или подготовки АПК, способных индуцировать ЦТЛ. Например, способ может включать стадии:

а: сбор АПК от субъекта:, и

б: введение полинуклеотида, кодирующего пептид по настоящему изобретению.

Стадию б можно выполнять, как описано выше в разделе «VI.

Антигенпредставляющие клетки».

Альтернативно, настоящее изобретение предоставляет способ подготовки антигенпредставляющей клетки (АПК), которая специфически индуцирует активность ЦТЛ против FOXM1, где способ включает одну из следующих стадий:

(а) Контактирование АПК с пептидом по настоящему изобретению *in vitro, ex vivo*

5 или *in vivo*; и

(б) введение полинуклеотида, кодирующего пептид по настоящему изобретению, в АПК.

(2) Способ индуцирования ЦТЛ

Более того, настоящее изобретение предоставляет способы индуцирования ЦТЛ с

10 помощью пептидов, полинуклеотидов, или экзосом или АПК по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также предоставляет способы индуцирования ЦТЛ с помощью полинуклеотида, кодирующего полипептид, который способен образовывать субъединицу Т-клеточного рецептора (ТКР), распознающую комплекс пептидов по

15 настоящему изобретению и HLA-антител. Предпочтительно, способы индуцирования ЦТЛ включают, по меньшей мере, одну стадию, выбранную из группы, состоящей из:

а) контактирование CD8-положительных Т-клеток с антигенпредставляющей клеткой и/или экзосомой, которая представляет на своей поверхности комплекс HLA-антитела и пептида по настоящему изобретению; и

20 б) введение полинуклеотида, кодирующего полипептид, который способен образовывать ТКР-субъединицу,ирующую комплекс пептида по настоящему изобретению и HLA-антитела в CD8-положительных клетках.

В случае, когда пептиды, полинуклеотиды, АПК, или экзосомы по настоящему изобретению вводят субъекту, в организме субъекта индуцируются ЦТЛ, и возрастает

25 сила иммунный ответа, нацеленного на раковые клетки. Таким образом, настоящее изобретение также предусматривает способ, который включает стадию введения пептидов, полинуклеотидов, АПК или экзосом по настоящему изобретению субъекту для индуцирования ЦТЛ.

Альтернативно, можно также индуцировать ЦТЛ путем их использования *ex vivo*.

30 В таком случае, после индукции ЦТЛ, активированные ЦТЛ можно было бы вернуть субъекту. Например, способ по настоящему изобретению для индуцирования ЦТЛ может включать стадии:

а) сбор АПК от субъекта;

б) контактирование АПК со стадии а) с пептидом; и

35 в) совместное культивирование АПК со стадии б) с CD8-положительными клетками.

АПК, совместно культивируемые с CD8-положительными клетками в вышеприведенной стадии с также можно подготовить путем передачи гена, который включает полинуклеотид по настоящему изобретению, в АПК, как описано выше в разделе «VI. Антигенпредставляющие клетки», но без ограничения этим, и любые АПК,

40 которые эффективно представляют на своей поверхности комплекс HLA-антитела и пептида по настоящему изобретению, можно использовать для быстрого способа.

Вместо таких АПК можно также использовать экзосомы, которые представляют на своей поверхности комплекс HLA-антитела и пептида по настоящему изобретению. А именно, настоящее изобретение также предусматривает способ, при котором экзосомы,

45 представляющие на своей поверхности комплекс HLA-антитела и пептида по настоящему изобретению, совместно культивируют с CD8-положительными клетками. Такие экзосомы можно подготовить при помощи способов, описанных выше в разделе «V. Экзосомы».

Более того, ЦТЛ можно индуцировать введением гена, который включает полинуклеотид, кодирующий ТКР-субъединицу, связывающуюся с пептидом по настоящему изобретению в CD8-положительных клетках. Такую передачу можно осуществлять, как описано выше в разделе «VIII. Т-клеточный рецептор (ТКР)».

5 Кроме того, настоящее изобретение предоставляет способ или процесс изготовления фармацевтического вещества или композиции, индуцирующего ЦТЛ, где способ включает стадию примешивания или составления рецептуры пептида по настоящему изобретению с фармацевтически приемлемым носителем.

(3) Способ индукции иммунного ответа

10 Более того, настоящее изобретение предоставляет способы индукции иммунного ответа в отношении заболеваний, связанных с FOXM1. Подходящее заболевание включает рак, примеры которого включают AML, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, холангиоцеллюлярный рак, CML, 15 колоректальный рак, рак пищевода, рак желудка, рак желудка диффузного типа, рак печени, NSCLC, лимфому, остеосаркому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечную карциному, мелкоклеточный рак легкого, опухоль мягких тканей и опухоль яичка.

Способы включают стадию введения веществ или композиций, содержащих любой из пептидов по настоящему изобретению или полинуклеотиды, кодирующие их.

20 Настоящий способ по изобретению также предусматривает введение экзосом или АПК, представляющих любой из пептидов по настоящему изобретению. Более подробно смотри в пункте «IX. Фармацевтические вещества или композиции», особенно в части, описывающей применение фармацевтических веществ или композиций по настоящему изобретению в качестве вакцин. Кроме того, экзосомы и АПК, которые можно 25 использовать в настоящих способах для индукции иммунного ответа, подробно описаны в пунктах «V. Экзосомы», «VI. Антигенпредставляющие клетки (АПК)», и (1) и (2) «X. Способы использования пептидов, экзосом, АПК и ЦТЛ», смотри выше.

Настоящее изобретение также предоставляет способ или процесс для изготовления фармацевтического вещества или композиции, индуцирующей иммунный ответ, где 30 способ включает стадию примешивания или составления рецептуры пептида по настоящему изобретению с фармацевтически приемлемым носителем.

Альтернативно, способ по настоящему изобретению может включать стадию введения вакцины или фармацевтической композиции, которая содержит:

(a) пептида по настоящему изобретению;

35 (b) нуклеиновую кислоту, кодирующую такой пептид, как раскрыто здесь, в экспрессируемой форме;

(c) АРС или экзосому, представляющую пептид по настоящему изобретению на своей поверхности;

(d) цитотоксическую Т-клетку по настоящему изобретению.

40 В настоящем изобретении рак, сверхэкспрессирующий FOXM1, можно лечить с помощью этих активных ингредиентов. Рак включает, в качестве неограничивающих примеров, AML, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, холангиоцеллюлярный рак, CML, колоректальный рак, рак пищевода, рак желудка, рак желудка диффузного типа, рак печени, NSCLC, лимфому, остеосаркому, рак

45 яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечную карциному, мелкоклеточный рак легкого, опухоль мягких тканей и опухоль яичка. Соответственно, перед введением вакцин или фармацевтических композиций, содержащих активные ингредиенты, предпочтительно подтвердить, что уровень экспрессии FOXM1 в

подлежащий лечению раковых клетках или тканях увеличен по сравнению с нормальными клетками того же органа. Таким образом, в одном варианте осуществления, настоящее изобретение предоставляет способ лечения рака, (сверх) экспрессирующего FOXM1, который может включать стадии:

- 5 i) определение уровня экспрессии FOXM1 в раковых клетках или тканях, полученных от субъекта с подлежащим лечению раком;
- ii) сравнение уровня экспрессии FOXM1 с нормальным контролем; и
- iii) введение, по меньшей мере, одного компонента, выбранного из группы, состоящей из (a) - (d), описанной выше, субъекту с раком, сверхэкспрессирующим FOXM1 по
- 10 сравнению с нормальным контролем. Альтернативно, настоящее изобретение также предоставляет вакцину и фармацевтическую композицию, содержащую, по меньшей мере, один компонент, выбранный из группы, состоящей из (a) - (d), описанной выше, для применения при введении субъекту с раком, сверхэкспрессирующим FOXM1. Иными словами, настоящее изобретение дополнительно предоставляет способ идентификации
- 15 субъекта, подлежащего лечению полипептидом FOXM1 по настоящему изобретению, который может включать стадию определения уровня экспрессии FOXM1 в полученных от субъекта раковых клетках или тканях, где увеличение уровня по сравнению с нормальным контрольным уровнем гена указывает на то, что субъект имеет рак, который можно лечить полипептидом FOXM1 по настоящему изобретению. Способ
- 20 лечения рака по настоящему изобретению будет описан более подробно ниже.

Подлежащий лечению при помощи настоящего способа субъект предпочтительно является млекопитающим. Типичные млекопитающие включают, в качестве неограничивающих примеров, человека, отличного от человека примата, мышь, крысу, собаку, кошку, лошадь и корову.

- 25 В соответствии с настоящим изобретением, определяют уровень экспрессии FOXM1 в раковых клетках или тканях, полученных от субъекта. Уровень экспрессии можно определить на уровне продукта транскрипции (нуклеиновой кислоты), используя способы, известные в рассматриваемой области. Например, мРНК FOXM1 можно количественно определить с помощью зондов при помощи способов гибридизации
- 30 (например, Нозерн-гибридизации). Определение можно проводить на чипе или матрице. Использование матрицы является предпочтительным для определения уровня экспрессии FOXM1. Специалист в рассматриваемой области может подготовить такие зонды, используя информацию о последовательности FOXM1. Например, в качестве зондов можно использовать кДНК FOXM1. При необходимости, зонды можно пометить с
- 35 помощью подходящей метки, такой как красители, флуоресцентные вещества и изотопы, и уровень экспрессии гена можно детектировать по интенсивности гибридизованных меток.

- Более того, продукт транскрипции FOXM1 (например, SEQ ID NO: 34) можно количественно определять при помощи праймеров с использованием способов на
- 40 основе амплификации (например, RT-PCR). Такие праймеры можно также подготовить на основе имеющейся информации о последовательности гена.

- В конкретном плане, зонд или праймер, используемый в настоящем способе, гибридизуется при жестких, умеренно жестких или нежестких условиях с мРНК FOXM1. Как используется здесь, выражение «строгие условия (гибридизации)» означает условия, 45 при которых зонд или праймер будет гибридизоваться со своей последовательностью-мишенью, но не с другой последовательностью. Жесткие условия являются зависимыми от последовательности и будут разными при различных условиях. Специфическая гибридизация более длинных последовательностей наблюдается при более высоких

температурах, чем более коротких последовательностей. Как правило, температуру при жестких условиях выбирают на приблизительно 5 градусов С ниже, чем на тепловая температура плавления (T_m) для конкретной последовательности, при определенной ионной силе и pH. T_m представляет собой температуру (при определенной ионной силе,

- 5 pH и концентрации нуклеиновых кислот), при которой 50% зондов, комплементарных своей последовательности-мишени, гибридизуются с последовательностью-мишенью в равновесии. Поскольку последовательность-мишень, как правило, присутствует в избытке, при T_m 50% зондов находятся в равновесии. Как правило, жесткими будут условия, при которых концентрация соли составляет менее чем около 1,0 М ионов
- 10 натрия, как правило, от около 0,01 до 1,0 М ионов натрия (или других солей) при pH от 7,0 до 8,3, и температура составляет, по меньшей мере, около 30 градусов С для коротких зондов или праймеров (например, от 10 до 50 нуклеотидов) и, по меньшей мере, около 60 градусов С для более длинных зондов или праймеров. Жесткие условия также можно достичь добавлением дестабилизирующих веществ, таких, как формамид.

- 15 Альтернативно, продукт трансляции детектировать для диагностики по настоящему изобретению. Например, можно определить количество белка FOXM1 (SEQ ID NO: 34). Способы определения количества белка как продукта трансляции включают способы иммуноанализа, в которых используется антитело, специфически узнающее белок. Антитело может являться моноклональным и поликлональным. Более того, для
- 20 детектирования 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 связывания с белком FOXM1. Способы подготовки этих видов антител для детектирования белков известны в рассматриваемой области, и любой способ можно использовать по настоящему
- 25 изобретению для подготовки таких антител и их эквивалентов.

- В качестве еще одного способа детектирования уровня экспрессии гена FOXM1, основанного на его продукте трансляции, можно определять интенсивность окраски при помощи иммуногистохимического анализа с использованием антител против белка FOXM1. То есть при этом определении сильное окрашивание указывает на увеличенное
- 30 присутствие белка/ увеличенный уровень и в то же время на высокий уровень экспрессии гена FOXM1.

- Уровень экспрессии гена-мишени, например, в том числе гена FOXM1, в раковых клетках можно определить как увеличенный, если уровень превышает контрольный уровень (например, уровень в нормальных клетках) соответствующего гена-мишени,
- 35 например, на 10%, 25% или 50%, или увеличен до более чем в 1,1 раза, более чем в 1,5 раза, более чем в 2,0 раза, больше чем в 5,0 раз, более чем в 10,0 раз или больше.

- Контрольный уровень можно определять одновременно с раковыми клетками, используя предварительно собранные и сохраненные образец(ы) от субъекта/субъектов, чей статус заболевания (злокачественное и доброкачественное) известен. Кроме того,
- 40 в качестве нормального контроля можно использовать нормальные клетки, полученные из не-раковых участков органа, который имеет подлежащий лечению рак.

- Альтернативно, контрольный уровень может определить при помощи статистического способа на основании результатов, полученных путем анализа ранее определенного (ых) уровня(ней) экспрессии гена FOXM1 в образцах, полученных от субъектов, чей
- 45 статус заболевания известен. Кроме того, контрольный уровень можно получать из базы данных примеров экспрессий в ранее проверенных клетках. Более того, в соответствии с аспектом данного изобретения, уровень экспрессии гена FOXM1 в биологическом образце можно сравнивать с несколькими контрольными уровнями,

которые определяются из нескольких эталонных образцов. Предпочтительным является использование контрольного уровня, определенного по эталонному образцу, полученному из тканей того же типа, что биологический образец, полученный от субъекта. Более того, предпочтительно использовать стандартное значение уровней

5 экспрессии гена FOXM1 в популяции с известным статусом заболевания. Стандартное значение можно получить любым способом, известным в рассматриваемой области. Например, диапазон от среднее +/-2 С.О. до среднее +/-3 С.О. можно использовать в качестве стандартного значения.

В контексте настоящего изобретения, контрольный уровень, определенный по

10 биологическому образцу, о котором известно, что он не является раковым, называется «нормальным контрольным уровнем». С другой стороны, если контрольный уровень определяется из ракового биологического образца, то он называется «раковым контрольным уровнем».

В случае, когда уровень экспрессии гена FOXM1 увеличен по сравнению с

15 нормальным контрольным уровнем или сходен/эквивалентен раковому контрольному уровню, субъекту может быть диагностирован подлежащий лечению рак. Более конкретно, настоящее изобретение предоставляет способ (i) диагностики того, имеет ли субъект подлежащий лечению рак, и/или (ii) выбора субъекта для лечения рака, который включает стадии:

20 а) определение уровня экспрессии FOXM1 в раковых клетках или ткани(ях), полученные от субъекта, у которого подозревается рак, подлежащий лечению;
 б) сравнение уровня экспрессии FOXM1 с нормальным контрольным уровнем;
 в) диагностика субъекта, как имеющего подлежащий лечению рак, на предмет увеличения уровня экспрессии FOXM1 по сравнению с нормальным контрольным
 25 уровнем; и
 д) выбор субъекта для лечения рака, если субъект диагностируется как имеющий подлежащий лечению рак, со стадии с).

Альтернативно, такой способ включает стадии:

20 а) определение уровня экспрессии FOXM1 в раковых клетках или ткани(ях), полученные от субъекта, у которого подозревается рак, подлежащий лечению;
 б) сравнение уровня экспрессии FOXM1 с раковым контрольным уровнем;
 в) диагностика субъекта, как имеющего подлежащий лечению рак, на предмет увеличения уровня экспрессии FOXM1 по сравнению с раковым контрольным уровнем;
 и
 35 д) выбор субъекта для лечения рака, если субъект диагностируется как имеющий подлежащий лечению рак, со стадии с).

Настоящее изобретение также предоставляет комплект для определения субъекта, страдающего от рака, которого можно лечить полипептидами FOXM1 по настоящему изобретению, который также может быть полезен при оценке и/или мониторинге
 40 эффективности иммунотерапии рака. Предпочтительно, рак включает, в качестве неограничивающих примеров, AML, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, холангiocеллюлярный рак, CML, колоректальный рак, рак пищевода, рак желудка, рак желудка диффузного типа, рак печени, NSCLC, лимфому, остеосаркому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечную
 45 карциному, мелкоклеточный рак легкого, опухоль мягких тканей и опухоль яичка. Конкретнее, комплект предпочтительно включает, по меньшей мере, один реактив для детектирования экспрессии гена FOXM1 в полученных от субъекта раковых клетках, который может быть выбран из группы:

- (a) реактив для детектирования мРНК в гене FOXM1;
- (b) реактив для детектирования белка FOXM1; и
- (c) реактив для детектирования биологической активности белка FOXM1.

Подходящие реактивы для детектирования мРНК в гене FOXM1 включают

- 5 нуклеиновые кислоты, которые специфически связываются с или идентифицируют мРНК FOXM1, такие как олигонуклеотиды, которые имеют последовательность, комплементарную части мРНК FOXM1. Эти виды олигонуклеотидов являются примером праймеров и зондов, которые являются специфическими для мРНК FOXM1. Эти виды олигонуклеотидов можно подготовить, основываясь на способах, известных в
- 10 рассматриваемой области. Если необходимо, реактив для детектирования мРНК FOXM1 можно иммобилизовать на твердой матрице. Более того, в комплект может быть включен более, чем один реактив для детектирования мРНК FOXM1.

- С другой стороны, подходящие реактивы для детектирования белка FOXM1 включают антитела к белку FOXM1. Антитело может являться моноклональным и
- 15 поликлональным. Более того, можно использовать любой фрагмент или модификацию (например, химерное антитело, scFv, Fab, F(ab')2, Fv и т.д.) антитела в качестве реактива, при условии, что фрагмент или модифицированное антитело сохраняет способность связывания с белком FOXM1. Способы подготовки этих видов антител для детектирования белков известны в рассматриваемой области, и любой способ можно
 - 20 использовать по настоящему изобретению для подготовки таких антител и их эквивалентов. Кроме того, антитела могут быть мечены молекулами, генерирующими сигнал, при помощи непосредственного соединение или методик опосредованной маркировки. Метки и способы мечения антител и детектирования связывания со своими
 - 25 мишениями известны в рассматриваемой области, и для настоящего изобретения можно использовать любые метки и способы. Кроме того, в комплект может быть включен более, чем один реактив для детектирования белка FOXM1.

Комплект может содержать более чем один из вышеупомянутых реактивов.

- Например, образцы тканей, полученные от субъектов без рака, или страдающих или не страдающих от рака могут служить в качестве полезных контрольных реактивов.
- 30 Комплект по настоящему изобретению может дополнительно включать другие материалы, желательные с коммерческой точки зрения и точки зрения потребителя, включая буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши (например, напечатанные, кассета, CD-ROM и т.д.) с инструкцией по применению. Эти реактивы и подобные можно сохранять в контейнере с этикеткой. Соответствующие контейнеры
 - 35 включают бутылки, флаконы и пробирки. Контейнеры могут быть сформированы из различных материалов, таких как стекло или пластик.

- В варианте осуществления настоящего изобретения в случае, когда реактивом является зонд против мРНК FOXM1, реактив может быть иммобилизован на твердой матрице, как, например, пористая полоска, для образования, по меньшей мере, одного участка детекции. Область измерения или детекции на пористой полоске может включать несколько участков, каждый из которых содержит нуклеиновую кислоту (зонд). Индикаторная полоска может также содержать участки для отрицательного и/или положительного контролей. Альтернативно, контрольный участок может быть расположен на полосе, отделенной от индикаторной полоски. Необязательно, различные участки детекции могут содержать разное количество иммобилизованных нуклеиновых кислот, то есть, большее количество на первом участке детекции и меньшие количества на последующих участках. При добавлении тестируемого образца ряд участков, отображающих детектируемый сигнал, обеспечивает количественную индикацию

количества мРНК FOXM1, присутствующей в образце. Участки детекции можно скомпоновать в любой подходящей детектируемой форме и, как правило, они представлены в форме полосы или точки, перекрывающей в ширину индикаторную полоску.

- 5 Комплект по настоящему изобретению может дополнительно включать образец положительного контроля или стандартный образец FOXM1. Образец положительного контроля по настоящему изобретению можно подготовить путем сбора FOXM1- положительных образцов, а затем анализа в них уровней FOXM1. Альтернативно, очищенный белок FOXM1 или полинуклеотид можно добавлять к клеткам, которые 10 не экспрессируют FOXM1, для образования положительного образца или образца FOXM1. В настоящем изобретении очищенный FOXM1 может являться рекомбинантный белок. Уровень FOXM1 в образце положительного контроля составляет, например, больше, чем малозначимая величина.

Следующие примеры приведены для иллюстрации настоящего изобретения и для 15 помоши специалистам при его изготовлении и применении. Примеры в любом случае не предназначены для ограничения иным образом сферы применения данного изобретения.

Примеры

Материалы и способы

20 Клеточные линии

TISI, HLA-A*2402 положительная В-лимфобластоидная клеточная линия, была приобретена в Клеточном и генном банке IHWG (Сиэтл, WA). COS7, линия почечных клеток африканской зеленои мартышки, была приобретена в ATCC.

Селекция подходящих пептидов, полученных из FOXM1

- 25 9-мерные и 10-мерные пептиды, полученных из FOXM1, которые связываются с молекулой HLA-A*2402, были предсказаны с помощью программного обеспечения для предсказания связывания «BIMAS» (www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind) (Parker et al. (J Immunol 1994, 152(1): 163-75), Kuzushima et al. (Blood 2001, 98(6): 1872-81)) и "NetMHC 3.0" (www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/) (Buus et al. (Tissue Antigens., 62:378-84, 2003), Nielsen et al. (Protein Sci., 12:1007-17, 2003, Bioinformatics, 20(9): 1388-97, 2004)). Эти пептиды 30 были синтезированы Biosynthesis (Льюисвилл, штат Техас) в соответствии со стандартным способом твердофазного синтеза и очищены при помоши обратнофазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Чистоту (>90%) и идентичность пептидов определяли путем аналитической ВЭЖХ и масс- 35 спектрометрического анализа, соответственно. Пептиды растворяли в диметилсульфоксиде до 20 мг/мл и хранили при -80 градусах С.

Индукция ЦТЛ *in vitro*

- Полученные на основе моноцитов дендритные клетки (ДК) были использованы в качестве антигенпредставляющих клеток для индуцирования ответов цитотоксических 40 Т-лимфоцитов (ЦТЛ) в отношении пептидов, представленных на лейкоцитарном антигене человека (HLA). ДК были образованы в экспериментах *in vitro*, как описано в другом месте (Nakahara S et al., Cancer Res 2003 JuI 15, 63(14): 4112-8). В конкретном плане, мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), полученные от 45 нормальных добровольцев (HLA-A*2402 положительные) при помоши раствора Ficoll- Plaque (Pharmacia), разделяли при помоши адгезии по пластиковым чашкам Петри (Becton Dickinson) с тем, чтобы обогатить их как фракцию моноцитов. Обогащенную моноцитами популяцию культивировали в присутствии 1000 ед./мл гранулоцит-макрофаг колониестимулирующего фактора (R&D Системы) и 1000 ед./мл интерлейкина (IL)-4

(R&D System) в среде AIM-V (Invitrogen), содержащей 2% инактивированной теплом аутологичной сыворотки крови (AS). После 7 дней культивирования цитокин-индуцированные ДК были подвергнуты импульсному взаимодействию с 20 мкг/мл каждого из синтезированных пептидов в присутствии 3 мкг/мл бета2-микроглобулина в течение 3 часов при 37 градусов С в среде AIM-V. Оказалось, что образованные клетки экспрессировали DC-специфические молекулы, такие как CD80, CD83, CD86 и HLA II класса, на своей клеточной поверхности (данные не представлены). Эти подвергнутые импульсному пептидному воздействию ДК затем инактивировали облучением рентгеновскими лучами (20 Гр) и смешивали в соотношении 1:20 с аутологичными CD8+ Т-клетками, полученными путем положительной селекции с использованием CD8 Positive Isolation Kit (Dynal). Эти культуры вносили в 48-луночный планшет (Corning); каждая лунка содержала $1,5 \times 10^4$ подвергнутых импульсному пептидному воздействию ДК, 3×10^5 CD8+ Т-клеток и 10 нг/мл IL-7 (R&D System) в 0,5 мл среды AIM-V/2% AS. Три дня спустя в эти культуры добавляли IL-2 (CHIRON) до конечной концентрации 20 МЕ/мл. На 7 и 14 день Т-клетки дополнительно стимулировали с помощью аутологичных подвергнутых импульсному пептидному воздействию ДК. ДК каждый раз подготавливали тем же способом, что описан выше. ЦТЛ тестировали против подвергнутых импульсному пептидному воздействию клеток TISI после 3-го раунда пептидной стимуляции на 21 день. (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1): 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9).

Методика размножения ЦТЛ

ЦТЛ размножали в культуре при помощи способа, аналогичного описанному (Walter EA et al., N Engl J Med 1995 Oct 19, 333(16): 1038-44; Riddell SR et al., Nat Med 1996 Feb, 2 (2): 216-23). Всего 5×10^4 ЦТЛ сусpendировали в 25 мл среды AIM-V/5% AS с 2 видами В-лимфобластоидных клеточных линий человека, инактивированных митомицином С, в присутствии 40 нг/мл моноклонального антитела анти-CD3 (Pharmingen). Через один день после начала культивирований к культуре добавляли 120 МЕ/мл IL-2. Культуры подпитывали свежей средой AIM-V/5% AS, содержащей 30 МЕ/мл IL-2, на 5, 8 и 11 день. (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1): 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9).

Образование клонов ЦТЛ

В 96-луночном планшете для микротитрования с круглодонными лунками (Nalge Nunc International) были сделаны разведения для получения 0,3, 1, и 3 ЦТЛ/лунку. ЦТЛ культивировали с 2 видами В-лимфобластоидных клеточных линий человека (1×10^4 клеток/лунку), 30 нг/мл антитела анти-CD3 и 125 ед/мл IL-2 в 150 мкл/лунку среды AIM-V, содержащей 5% AS. К среде через 10 дней добавляли 50 мкл/лунку IL-2, чтобы достичь конечной концентрации 125 ед/мл IL-2. Активность ЦТЛ проверяли на 14-й день и клоны ЦТЛ размножали, используя тот же способ, что и описанный выше (Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 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).

Специфическая активность ЦТЛ

Для исследования специфической активности ЦТЛ проводили интерферон(IFN)-гамма иммуноферментный спот-анализ (ELISPOT) и IFN-гамма иммуноферментный твердофазный анализ (ИФА). В конкретном плане, подвергнутых импульсному

пептидному воздействию TISI (1×10^4 клеток/лунку) подготавливали в качестве клеток-стимуляторов. Культивируемые в 48 лунках клетки использовали в качестве иммунокомпетентных клеток. IFN-гамма ELISPOT-анализ и IFN-гамма ИФА-анализа выполняли в рамках процедуры изготовления.

⁵ **Трансфекция плазмидами**

кДНК, кодирующая открытую рамку считывания генов-мишеней или HLA-A*2402, амплифицировали при помощи ПЦР. ПЦР-амплифицированные продукты клонировали в вектор pCAGGS. Плазмиды трансфицировали в COS7, которая является отрицательной по генам-мишеням и HLA-A24 линией клеток, используя лиофектамин 2000 (Invitrogen) в соответствии с рекомендациями изготовителя. Через 2 дня после трансфекции трансфицированные клетки собирали при помощи ЭДТК (Invitrogen) и использовали в качестве клеток-мишеней (5×10^4 клеток/лунку) для анализа активности ЦТЛ.

Результаты

¹⁵ **Предсказание HLA-A24-связывающихся пептидов, полученных из FOXM1**

Таблицы 1а и 1б демонстрируют HLA-A24-связывающиеся 9-мерные и 10-мерные пептиды FOXM1 в порядке высокой аффинности связывания. 29 пептидов (SEQ ID NO: 1-12 и SEQ ID NO: 15-31) были предсказаны BIMAS и 3 пептида (SEQ ID NO: 13-14 и SEQ ID NO: 32) были предсказаны NetMHC 3.0. В общей сложности были отобраны и изучены 32 пептида с потенциальной способностью связываться с HLA-A24 для того, чтобы определить эпитопные пептиды.

Таблица 1а

HLA-A24-связывающиеся 9-мерные пептиды, полученных из FOXM1

Начальное положение	Аминокислотная последовательность	Число очков	SEQ ID NO
316	RYLTLDQVF	432	1
262	IYTWIEDHF	140	2
451	LFNFIFLCL	50.4	3
455	IFLCLCSVLL	36	4
483	LFGEGLFSPL	28.8	5
443	DFGTPITSL	20	6
351	RNMTIKTEL	18.48	7
57	KFPAGIKII	15	8
133	RTEVTLETI	12	9
754	RSLTEGLVL	12	10
429	VFGYMSKFF	10	11
436	FFSGDLRDF	10	12
Начальное положение	Аминокислотная последовательность	Kd (нМ)	SEQ ID NO
524	EWSPSPAPSF	99	13
241	YMAMIQFAI	421	14

Таблица 1b

HLA-A24-связывающиеся 10-мерные пептиды, полученных из FOXM1

Начальное положение	Аминокислотная последовательность	Балльная оценка	SEQ ID NO
5	627 SYSQeVGGPF	140	15
	240 SYMAmIQFAI	105	16
	777 SFPGIDEDPL	30	17
	453 NFIFICLSVL	30	18
10	382 QFPVnQSLVL	30	19
	483 LFGEGFSPLL	24	20
	435 KFFSgDLRDF	20	21
	396 KVPLpLAASL	14.4	22
15	325 KPLDpGSPQL	14.4	23
	443 DFGTpITSLF	14	24
	318 LTLDqVFKPL	12.096	25
	713 RLLSsEPLDL	12	26
20	513 RPIKvESPPL	12	27
	7 RPLIIRRRRL	12	28
	376 SYLVpIQFPV	10.5	29
	390 VLQPsVKVPL	10.08	30
25	238 PYSYmAMIQF	10	31
	Начальное положение	Аминокислотная последовательность	Kd (нМ)
	264 TWIEDHFPYF	20	32
	SEQ ID NO		

Начальная позиция указывает номер аминокислотного остатка от N-конца FOXM1

Балльная оценка связывания и константа диссоциации [Kd (нМ)], полученные от «BIMAS» и «NetMHC 3.0».

Индукция ЦТЛ предсказанными пептидами из FOXM1, рестриктированными по

30 HLA-A*2402, и образование линий ЦТЛ, стимулированных пептидами, полученными из FOXM1.

ЦТЛ для пептидов, полученных из FOXM1, образовывали в соответствии с протоколами, как описано в разделе «Материалы и Способы». Специфическую ЦТЛ-активность пептидов определяли интерферон-гамма ELISPOT-анализом (Фигуры 1а-g). Он показал, что лунки с номерами #1, #4 и #7, стимулированными FOXM1-A24-9-262(SEQ ID NO: 2) (a), #7 - FOXM1-A24-9-351(SEQ ID NO: 7) (b), #5 - FOXM1-A24-9-57 (SEQ ID NO: 8) (c), #3 - FOXM1-A24-10-240(SEQ ID NO: 16) (d), #6 - FOXM1-A24-10-318 (SEQID NO: 25) (e), #4 - FOXM1-A24-10-390(SEQ ID NO: 30) (f) и #5 - FOXM1-A24-10-238 (SEQ ID NO:31) (g) продемонстрировали сильное продуцирование интерферона-гамма

40 по сравнению с контрольными лунками. С другой стороны, не было обнаружено сильного продуцирования интерферона-гамма при индуцировании другими пептидами, показанными в Таблицах 1а и 1б, несмотря на то, что эти пептиды обладали возможной активностью связывания с HLA-A*2402. Например, типично отрицательными являются данные по ЦТЛ-ответу, стимулированному FOXM1-A24-9-316(SEQ ID NO: 1) в 45 отношении подвергнутых импульсному пептидному воздействию клеток-мишеней (h). В результате, он показал, что 7 пептидов, полученных из FOXM1, были отобраны в качестве пептидов, которые могли сильно индуцировать ЦТЛ.

Создание линий и клонов ЦТЛ против пептидов, полученных из FOXM1

Клетки, которые продемонстрировали пептид-специфическую ЦТЛ-активность, обнаруженную при помощи интерферон-гамма ELISPOT-анализа в лунках с номерами #4 - с FOXM1-A24-9-262(SEQ ID NO: 2) (a), #3 - с FOXM1-A24-10-240(SEQ ID NO: 16) (b), #6 - с FOXM1-A24-10-318(SEQ ID NO: 25) (c) и #5 - с FOXM1-A24-10-238(SEQ ID NO: 31)

5 (d), размножали и образовывали линии ЦТЛ. ЦТЛ-активности этих линий ЦТЛ определяли интерферон-гамма ИФА-анализом (Фиг.2а-d). Он показал, что все линии ЦТЛ продемонстрировали сильное продуцирование интерферона-гамма в отношении клеток-мишеней, подвергнутых импульсному воздействию соответствующим пептидом, по сравнению с клетками-мишениями без импульсного пептидного воздействия. Более 10 того, клоны ЦТЛ были образованы путем ограничивающих разведений из линий ЦТЛ, и продуцирование IFN-гамма клонами ЦТЛ против клеток-мишеней, подвергнутых импульсному пептидному воздействию, определяли при помощи интерферон-гамма ИФА-анализа. Сильное продуцирование интерферона-гамма было выявлено у клонов ЦТЛ, стимулированных FOXM1-A24-9-262(SEQ ID NO: 2) (a), FOXM1-A24-10-240(SEQ 15 ID NO: 16) (b) и FOXM1-A24-10-238(SEQ ID NO: 31) (c) на Фиг.3.

Специфическая ЦТЛ-активность в отношении клеток-мишеней, экзогенно экспрессирующих FOXM1 и HLA-A*2402

Образованные линии и клоны ЦТЛ, образованные в отношении этих пептидов, были исследованы на их способность распознавать клетки-мишени, которые эндогенно

20 экспрессируют гены FOXM1 и HLA-A*2402. Специфическую ЦТЛ-активность против клеток COS7, трансфицированных как полноразмерным геном FOXM1, так и геном HLA-A*2402 (специфическая модель для клеток-мишеней, которые экзогенно экспрессируют гены FOXM1 и HLA-A*2402) проверяли при помощи линий и клонов ЦТЛ, образованных соответствующим пептидом, в качестве эффекторных клеток.

25 Клетки COS7, трансфицированные либо полноразмерным геном FOXM1, либо HLA-A*2402, были подготовлены в качестве контроля. На Фиг.4, ЦТЛ, стимулированные с FOXM1-A24-9-262(SEQ ID NO: 2), показали сильную ЦТЛ-активность против клеток COS7, экспрессирующих как FOXM1, так и HLA-A*2402. С другой стороны, никакой значительной специфической ЦТЛ-активности в отношении контроля не наблюдалось.

30 Таким образом, эти данные четко показали, что пептид FOXM1-A24-9-262(SEQ ID NO: 2) эндогенно процессировался и экспрессировался на клетках-мишениях с молекулами HLA-A*2402 и узнавался ЦТЛ. Эти результаты свидетельствуют, что этот пептид, полученный из FOXM1, может быть полезным при применении противораковых вакцин для больных с опухолями, экспрессирующими FOXM1.

35 Анализ гомологий антигенных пептидов

ЦТЛ, стимулированные FOXM1-A24-9-262 (SEQ ID NO: 2), FOXM1-A24-9-351 (SEQ ID NO: 7), FOXM1-A24-9-57 (SEQ ID NO: 8), FOXM1-A24-10-240 (SEQ ID NO: 16), FOXM1-A24-10-318 (SEQ ID NO: 25), FOXM1-A24-10-390 (SEQ ID NO: 30) и FOXM1-A24-10-238 (SEQ ID NO: 31) продемонстрировали значительную и специфическую ЦТЛ-активность.

40 Этот результат может быть связан с тем, что последовательности FOXM1-A24-9-262 (SEQ ID NO: 2), FOXM1-A24-9-351 (SEQ ID NO: 7), FOXM1-A24-9-57 (SEQ ID NO: 8), FOXM1-A24-10-240 (SEQ ID NO: 16) FOXM1-A24-10-318 (SEQ ID NO: 25) FOXM1-A24-10-390 (SEQ ID NO: 30) и FOXM1-A24-10-238 (SEQ ID NO: 31) гомологичны пептидам, полученным из других молекул, которые, как известно, повышают чувствительность

45 иммунной системы человека. Чтобы исключить такую возможность, для этих пептидных последовательностей были проведены анализы гомологий, используя в качестве запросов алгоритм BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi), который не выявил никаких последовательностей со значительной гомологией. Результаты анализов

гомологий показывает, что последовательности FOXM1-A24-9-262 (SEQ ID NO: 2), FOXM1-A24-9-351 (SEQ ID NO: 7), FOXM1-A24-9-57 (SEQ ID NO: 8), FOXM1-A24-10-240 (SEQ ID NO: 16) FOXM1-A24-10-318 (SEQ ID NO: 25) FOXM1-A24-10-390 (SEQ ID NO: 30) и FOXM1-A24-10-238 (SEQ ID NO: 31) являются уникальными и, таким образом,

5 существует небольшая возможность того, что, по нашим представлениям, эти молекулы повышают непредусмотренный иммунологический ответа на некоторые посторонние молекулы.

10 В заключение, были идентифицированы новые HLA-A24 эпитопные пептиды, полученных из FOXM1. Более того, было продемонстрировано, что эпитопный пептид из FOXM1 может применяться для иммунотерапии рака.

Применяемость в производственных условиях

15 Настоящее изобретение представляет новые ОСА, особенно те, которые получены из FOXM1, которые индуцируют сильные и специфические противоопухолевые иммунные ответы и имеют применимость для широкого спектра типов рака. Такие ОСА полезны в качестве пептидных вакцин против заболеваний, связанных с FOXM1, например, рака, в частности, AML, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака шейки матки, холангиоцеллюлярного рака, CML, колоректального рака, рака пищевода, рака желудка, рака желудка диффузного типа, рака печени, NSCLC, лимфомы, остеосаркомы, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечной карциномы, мелкоклеточного рака легкого, опухоли мягких тканей и опухоли яичка.

20 Несмотря на то что настоящее изобретение описано здесь подробно и с учетом конкретных вариантов его осуществления, следует понимать, что вышеупомянутое описание носит примерный и разъяснительный характер и предназначено для 25 иллюстрации настоящего изобретения и его предпочтительных вариантов осуществления. Путем проведения экспериментов любой специалист в рассматриваемой области без труда признает, что различные изменения и модификация могут быть сделаны в этом без отступления от сущности и области применения настоящего изобретения, объем и границы которого определены в прилагаемых пунктах формулы 30 изобретения.

Формула изобретения

1. Выделенный пептид, обладающий способностью индуцировать цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) в присутствии антигенпредставляющих клеток (АПК), несущих 35 HLA-A*2402, где пептид выбран из группы, состоящей из:

(а) выделенного пептида, который состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 7, 8, 16, 25, 30 и 31,

40 (б) выделенного пептида, который состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, 7, 8, 16, 25, 30 или 31, в которой вторая аминокислота от N-конца, выбранная из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 7, 8, 16, 25, 30 и 31, замещена аминокислотой, выбранной из группы фенилаланина, тирозина, метионина и триптофана, и/или С-концевая аминокислота, выбранная из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 7, 8, 16, 25, 30 и 31, замещена аминокислотой, выбранной из группы фенилаланина, лейцина, изолейцина и триптофана.

45 2. Выделенный пептид по п.1, который представляет собой нонапептид или декапептид.

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

4. Композиция для индуцирования ЦТЛ, где композиция содержит в качестве

активного ингредиента один или несколько пептидов по п.1 или 2 в подходящей дозе, где указанная композиция составлена для введения субъекту, у которого HLA-антитело представляет собой HLA-A*2402.

5. Фармацевтическая композиция для лечения и/или профилактики рака,

5 экспрессирующего FOXM1, и/или предупреждения его послеоперационных рецидивов, где композиция содержит в качестве активного ингредиента один или несколько пептидов по п.1 или 2 в подходящей дозе, где указанная фармацевтическая композиция составлена для введения субъекту, у которого HLA-антитело представляет собой HLA-A*2402.

10 6. Фармацевтическая композиция по п.5, которая составлена для лечения рака.

7. Способ индуцирования антигенпредставляющих клеток (АПК) со способностью индуцировать ЦТЛ, включающий одну из следующих стадий:

(a) контактирование АПК, несущих HLA-A*2402, с пептидом по п.1 или 2 *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*; и

15 (b) введение полинуклеотида, кодирующего пептид по п.1 или 2 в экспрессируемой форме, в АПК, несущую HLA-A*2402.

8. Способ индуцирования ЦТЛ при помощи любого из способов, включающих, по меньшей мере, одну из следующих стадий:

(a) совместное культивирование CD8-положительных Т-клеток с АПК, которые

20 представляют на своей поверхности комплекс HLA-A*2402 и пептида по п.1 или 2;

(b) совместное культивирование CD8-положительных Т-клеток с экзосомами, которые представляют на своей поверхности комплекс HLA-A*2402 и пептида по п.1 или 2.

9. Выделенная АПК со способностью индуцировать ЦТЛ, которая представляет на своей поверхности комплекс HLA-A*2402 и пептид по п.1 или 2.

25 10. АПК по п.9, которая индуцирована способом по п.7.

11. Способ индуцирования иммунного ответа против рака, экспрессирующего FOXM1, у субъекта, у которого HLA-антитело представляет собой HLA-A*2402, где указанный способ включает стадию введения субъекту композиции, содержащей пептид по п.1 или 2.

30

35

40

45

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.

<120> ПЕПТИДЫ FOXM1 И ВАКЦИНЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ИХ

<130> ONC-A0901P

<150> US 61/153,408

<151> 2009-02-18

<160> 38

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 1

Arg Tyr Leu Thr Leu Asp Gln Val Phe
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 2

Ile Tyr Thr Trp Ile Glu Asp His Phe
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 3

Leu Phe Asn Phe Ile Phe Leu Cys Leu
1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 4

Ile Phe Leu Cys Leu Ser Val Leu Leu
1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 5

Leu Phe Gly Glu Gly Phe Ser Pro Leu
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 6

Asp Phe Gly Thr Pro Ile Thr Ser Leu
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 7

Arg Asn Met Thr Ile Lys Thr Glu Leu
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 8

Lys Phe Pro Ala Gly Ile Lys Ile Ile
1 5

<210> 9

<211> 9
<212> PRT
<213> Искусственный

<220>
<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 9

Arg Thr Glu Val Thr Leu Glu Thr Leu
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Искусственный

<220>
<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 10

Arg Ser Leu Thr Glu Gly Leu Val Leu
1 5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Искусственный

<220>
<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 11

Val Phe Gly Tyr Met Ser Lys Phe Phe
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Искусственный

<220>
<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 12

Phe Phe Ser Gly Asp Leu Arg Asp Phe
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Искусственный

<220>
<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 13

Glu Trp Pro Ser Pro Ala Pro Ser Phe
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Искусственный

<220>
<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 14

Tyr Met Ala Met Ile Gln Phe Ala Ile
1 5

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> Искусственный

<220>
<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 15

Ser Tyr Ser Gln Glu Val Gly Gly Pro Phe
1 5 10

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> Искусственный

<220>
<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 16

Ser Tyr Met Ala Met Ile Gln Phe Ala Ile
1 5 10

<210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> Искусственный

<220>
<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 17

Ser Phe Pro Gly Leu Asp Glu Asp Pro Leu
1 5 10

<210> 18
<211> 10
<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 18

Asn Phe Ile Phe Leu Cys Leu Ser Val Leu
1 5 10

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 19

Gln Phe Pro Val Asn Gln Ser Leu Val Leu
1 5 10

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 20

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

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 21

Lys Phe Phe Ser Gly Asp Leu Arg Asp Phe
1 5 10

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 22

Lys Val Pro Leu Pro Leu Ala Ala Ser Leu

1 5 10

<210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
 <400> 23

Lys Pro Leu Asp Pro Gly Ser Pro Gln Leu
 1 5 10

<210> 24
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
 <400> 24

Asp Phe Gly Thr Pro Ile Thr Ser Leu Phe
 1 5 10

<210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
 <400> 25

Leu Thr Leu Asp Gln Val Phe Lys Pro Leu
 1 5 10

<210> 26
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
 <400> 26

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

<210> 27
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>

<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 27

Arg Pro Ile Lys Val Glu Ser Pro Pro Leu
1 5 10

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 28

Arg Pro Leu Ile Leu Lys Arg Arg Arg Leu
1 5 10

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 29

Ser Tyr Leu Val Pro Ile Gln Phe Pro Val
1 5 10

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 30

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

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 31

Pro Tyr Ser Tyr Met Ala Met Ile Gln Phe
1 5 10

<210> 32
<211> 10
<212> PRT
<213> Искусственный

<220>
<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 32

Thr Trp Ile Glu Asp His Phe Pro Tyr Phe
1 5 10

<210> 33
<211> 3641
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 33
actgaaagct ccggtgccag acccccacccc cgccccccggc ccgggacccc ctccccctccc 60
gggatcccccc ggggttccca ccccgccccgc accgccccggg accccggccgg tccggcgcga 120
gccccccgtcc ggggcccctgg ctcggcccccc aggttggagg agcccgaggc ccgccttcgg 180
agctacggcc taacggcggc ggcgactgca gtctggaggg tccacacttg tgattctcaa 240
tggagagtga aaacgcagat tcataatgaa aactagcccc cgtcggccac tgattctcaa 300
aagacggagg ctgcccccttc ctgttcaaaa tgccccaagt gaaacatcag aggaggaacc 360
taagagatcc cctgccccaaac aggagtctaa tcaagcagag gcctccaagg aagtggcaga 420
gtccaactct tgcaagtttc cagctggat caagattatt aaccacccca ccatgccccaa 480
cacgcaagta gtggccatcc ccaacaatgc taatattcac agcatcatca cagcactgac 540
tgcccaagggaa aaagagagtg gcagtagtgg gcccaacaaa ttcatcctca tcagctgtgg 600
gggagccccca actcagcctc caggactccg gcctcaaacc caaaccagct atgatgccaa 660
aaggacagaa gtgaccctgg agaccttggg accaaaacct gcagctaggg atgtgaatct 720
tcctagacca cctggagccc tttgcgagca gaaacgggag acctgtgcag atggtgaggc 780
agcaggctgc actatcaaca atagcctatc caacatccag tggcttcgaa agatgagttc 840
tgatggactg ggctcccgca gcatcaagca agagatggag gaaaaggaga attgtcacct 900
ggagcagcga caggttaagg ttgaggagcc ttgcagacca tcagcgtcct ggcagaactc 960
tgtgtctgag cggccaccct actcttacat ggcacatgata caattcgcca tcaacagcac 1020
tgagaggaag cgcatgactt tgaaagacat ctatacgtgg attgaggacc actttcccta 1080
ctttaagcac attgccaagc caggctggaa gaactccatc cgccacaacc tttccctgca 1140
cgacatgttt gtccgggaga cgtctgccaa tggcaaggtc tccttcgga ccattcaccc 1200
cagtgccaaac cgctacttga cattggacca ggtgtttaag ccactggacc cagggctc 1260
acaattgccc gagcacttgg aatcacagca gaaacgaccg aatccagagc tccgccccggaa 1320

catgaccatc aaaaccgaac tccccctggg cgcacggcgg aagatgaagc cactgctacc	1380
acgggtcagc tcataacctgg taccttatcca gttcccggtg aaccagtcac tggtgttgc	1440
gccctcggtg aaggtgccat tgcccctggc ggcttccctc atgagcttag agcttgcgg	1500
ccatagcaag cgagtccgca ttgccccaa ggttttggg gaacaggtgg tgtttggta	1560
catgagtaag ttcttagtg gcgatctgctg agatttggt acacccatca ccagcttgc	1620
taattttatc tttcttgc tatcagtgc gctagctgag gaggggatag ctcctcttc	1680
ttctgcagga ccagggaaag aggagaaact cctgtttgga gaagggttt ctccttgct	1740
tccagttcag actatcaagg aggaagaaat ccagcctggg gaggaaatgc cacacttagc	1800
gagacccatc aaagtggaga gccctccctt ggaagagtgg ccctccccgg ccccatctt	1860
caaagaggaa tcatctact cctgggagga ttcgtcccaa tctcccaccc caagacccaa	1920
gaagtccatc agtgggctta ggtcccaac ccgggtgtgc tcggaaatgc ttgtgattca	1980
acacagggag aggagggaga ggagccggtc tcggaggaaa cagcatctac tgcctccctg	2040
tgtggatgag ccggagctgc tcttctcaga ggggcccagt acttccgct gggccgcaga	2100
gctcccggttc ccagcagact cctctgaccc tgccctccag ctcagctact cccaggaagt	2160
gggaggacct tttaagacac ccattaagga aacgctgccc atctccctca ccccgagcaa	2220
atctgtcctc cccagaaccc ctgaatccctg gaggttcacg ccccccagcca aagtaggggg	2280
actggatttc agcccagttac aaacctccca gggtgccct gaccccttgc ctgacccct	2340
ggggctgatg gatctcagca ccactccctt gcaaagtgc cccccccttgc aatcaccgca	2400
aaggctcctc agttcagaac ccttagaccc catctccgtc cccttggca actcttctcc	2460
ctcagatata gacgtccca agccaggctc cccggagcca caggtttctg gccttgcagc	2520
caatcgttct ctgacagaag gcctggccct ggacacaaatg aatgacagcc tcagcaagat	2580
cctgctggac atcagcttcc ctggcctgga cgaggaccca ctggccctg acaacatcaa	2640
ctggtccctg tttattccctg agtacagta gagccctgccc cttgcccctg tgctcaagct	2700
gtccaccatc ccgggcactc caaggcttag tgccacccaa gcctctgagtg gaggacagca	2760
ggcagggact gttctgctcc tcatagtcc ctgctgcctg attatgcata agtagcagtc	2820
acacccttagc cactgctggg accttgcgtt ccccaagagt atctgattcc tctgctgtcc	2880
ctgccaggag ctgaagggtg ggaacaacaa aggcaatggt gaaaagagat taggaacccc	2940
ccagcctgtt tccattctct gcccaggact ctcttacccctt ccctgatctt tgccagggtgg	3000
tccgtgtaaa tagtataat tctccaaatt atcctctaattataatgtta agcttatttc	3060
cttagatcat tatccagaga ctgccagaag gtgggttagga tgaccctgggg tttcaattga	3120
cttctgttcc ttgttttag ttttgataga agggaaagacc tgcagtgac ggtttcttcc	3180
aggctgaggt acctggatct tgggttcttcc actgcaggaa cccagacaag tggatctgct	3240

tgccagagtc	cttttgccc	ctccctgcca	cctccccgtg	tttccaagtc	agcttcctg	3300
caagaagaaa	tcctggtaa	aaaagtctt	tgtattgggt	caggagttga	atttggggtg	3360
ggaggatgga	tgcaactgaa	gcagagtgtg	ggtgcggaga	tgtgcgctat	tagatgttc	3420
tctgataatg	tccccaaatca	taccagggag	actggcattg	acgagaactc	aggtgaggc	3480
ttgagaaggc	cgaaagggcc	cctgacctgc	ctggcttcct	tagcttgc	ctcagcttg	3540
caaagagcc	cccttaggccc	cagctgaccg	catgggtgtg	agccagctt	agaacactaa	3600
ctactcaata	aaagcgaagg	tggacaaaaa	aaaaaaaaaa	a		3641

<210> 34
 <211> 801
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 34

Met	Lys	Thr	Ser	Pro	Arg	Arg	Pro	Leu	Ile	Leu	Lys	Arg	Arg	Arg	Leu
1															
															15

Pro	Leu	Pro	Val	Gln	Asn	Ala	Pro	Ser	Glu	Thr	Ser	Glu	Glu	Glu	Pro
															20
															25
															30

Lys	Arg	Ser	Pro	Ala	Gln	Gln	Glu	Ser	Asn	Gln	Ala	Glu	Ala	Ser	Lys
															35
															40
															45

Glu	Val	Ala	Glu	Ser	Asn	Ser	Cys	Lys	Phe	Pro	Ala	Gly	Ile	Lys	Ile
															50
															55
															60

Ile	Asn	His	Pro	Thr	Met	Pro	Asn	Thr	Gln	Val	Val	Ala	Ile	Pro	Asn
															65
															70
															75
															80

Asn	Ala	Asn	Ile	His	Ser	Ile	Ile	Thr	Ala	Leu	Thr	Ala	Lys	Gly	Lys
															85
															90
															95

Glu	Ser	Gly	Ser	Ser	Gly	Pro	Asn	Lys	Phe	Ile	Leu	Ile	Ser	Cys	Gly
															100
															105
															110

Gly	Ala	Pro	Thr	Gln	Pro	Pro	Gly	Leu	Arg	Pro	Gln	Thr	Gln	Thr	Ser
															115
															120
															125

Tyr	Asp	Ala	Lys	Arg	Thr	Glu	Val	Thr	Leu	Glu	Thr	Leu	Gly	Pro	Lys
															130
															135
															140

Pro	Ala	Ala	Arg	Asp	Val	Asn	Leu	Pro	Arg	Pro	Pro	Gly	Ala	Leu	Cys
															145
															150
															155
															160

Glu Gln Lys Arg Glu Thr Cys Ala Asp Gly Glu Ala Ala Gly Cys Thr

165

170

175

Ile Asn Asn Ser Leu Ser Asn Ile Gln Trp Leu Arg Lys Met Ser Ser
 180 185 190

Asp Gly Leu Gly Ser Arg Ser Ile Lys Gln Glu Met Glu Glu Lys Glu
 195 200 205

Asn Cys His Leu Glu Gln Arg Gln Val Lys Val Glu Glu Pro Ser Arg
 210 215 220

Pro Ser Ala Ser Trp Gln Asn Ser Val Ser Glu Arg Pro Pro Tyr Ser
 225 230 235 240

Tyr Met Ala Met Ile Gln Phe Ala Ile Asn Ser Thr Glu Arg Lys Arg
 245 250 255

Met Thr Leu Lys Asp Ile Tyr Thr Trp Ile Glu Asp His Phe Pro Tyr
 260 265 270

Phe Lys His Ile Ala Lys Pro Gly Trp Lys Asn Ser Ile Arg His Asn
 275 280 285

Leu Ser Leu His Asp Met Phe Val Arg Glu Thr Ser Ala Asn Gly Lys
 290 295 300

Val Ser Phe Trp Thr Ile His Pro Ser Ala Asn Arg Tyr Leu Thr Leu
 305 310 315 320

Asp Gln Val Phe Lys Pro Leu Asp Pro Gly Ser Pro Gln Leu Pro Glu
 325 330 335

His Leu Glu Ser Gln Gln Lys Arg Pro Asn Pro Glu Leu Arg Arg Asn
 340 345 350

Met Thr Ile Lys Thr Glu Leu Pro Leu Gly Ala Arg Arg Lys Met Lys
 355 360 365

Pro Leu Leu Pro Arg Val Ser Ser Tyr Leu Val Pro Ile Gln Phe Pro
 370 375 380

Val Asn Gln Ser Leu Val Leu Gln Pro Ser Val Lys Val Pro Leu Pro
 385 390 395 400

Leu Ala Ala Ser Leu Met Ser Ser Glu Leu Ala Arg His Ser Lys Arg
 405 410 415

Val Arg Ile Ala Pro Lys Val Phe Gly Glu Gln Val Val Phe Gly Tyr

420

425

430

Met Ser Lys Phe Phe Ser Gly Asp Leu Arg Asp Phe Gly Thr Pro Ile
 435 440 445

Thr Ser Leu Phe Asn Phe Ile Phe Leu Cys Leu Ser Val Leu Leu Ala
 450 455 460

Glu Glu Gly Ile Ala Pro Leu Ser Ser Ala Gly Pro Gly Lys Glu Glu
 465 470 475 480

Lys Leu Leu Phe Gly Glu Gly Phe Ser Pro Leu Leu Pro Val Gln Thr
 485 490 495

Ile Lys Glu Glu Glu Ile Gln Pro Gly Glu Glu Met Pro His Leu Ala
 500 505 510

Arg Pro Ile Lys Val Glu Ser Pro Pro Leu Glu Glu Trp Pro Ser Pro
 515 520 525

Ala Pro Ser Phe Lys Glu Glu Ser Ser His Ser Trp Glu Asp Ser Ser
 530 535 540

Gln Ser Pro Thr Pro Arg Pro Lys Lys Ser Tyr Ser Gly Leu Arg Ser
 545 550 555 560

Pro Thr Arg Cys Val Ser Glu Met Leu Val Ile Gln His Arg Glu Arg
 565 570 575

Arg Glu Arg Ser Arg Ser Arg Arg Lys Gln His Leu Leu Pro Pro Cys
 580 585 590

Val Asp Glu Pro Glu Leu Leu Phe Ser Glu Gly Pro Ser Thr Ser Arg
 595 600 605

Trp Ala Ala Glu Leu Pro Phe Pro Ala Asp Ser Ser Asp Pro Ala Ser
 610 615 620

Gln Leu Ser Tyr Ser Gln Glu Val Gly Gly Pro Phe Lys Thr Pro Ile
 625 630 635 640

Lys Glu Thr Leu Pro Ile Ser Ser Thr Pro Ser Lys Ser Val Leu Pro
 645 650 655

Arg Thr Pro Glu Ser Trp Arg Leu Thr Pro Pro Ala Lys Val Gly Gly
 660 665 670

Leu Asp Phe Ser Pro Val Gln Thr Ser Gln Gly Ala Ser Asp Pro Leu

675

680

685

Pro Asp Pro Leu Gly Leu Met Asp Leu Ser Thr Thr Pro Leu Gln Ser
 690 695 700

Ala Pro Pro Leu Glu Ser Pro Gln Arg Leu Leu Ser Ser Glu Pro Leu
 705 710 715 720

Asp Leu Ile Ser Val Pro Phe Gly Asn Ser Ser Pro Ser Asp Ile Asp
 725 730 735

Val Pro Lys Pro Gly Ser Pro Glu Pro Gln Val Ser Gly Leu Ala Ala
 740 745 750

Asn Arg Ser Leu Thr Glu Gly Leu Val Leu Asp Thr Met Asn Asp Ser
 755 760 765

Leu Ser Lys Ile Leu Leu Asp Ile Ser Phe Pro Gly Leu Asp Glu Asp
 770 775 780

Pro Leu Gly Pro Asp Asn Ile Asn Trp Ser Gln Phe Ile Pro Glu Leu
 785 790 795 800

Gln

<210> 35
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственный

<220>
 <223> Искусственная последовательность

<400> 35
 gtctaccagg cattcgcttc at

22

<210> 36
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственный

<220>
 <223> Искусственная последовательность

<400> 36
 tcagctggac cacagccgca gcgt

24

<210> 37
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственный

<220>

«223» Искусственная последовательность

<400> 37
tcagaaatcc tttctcttga c

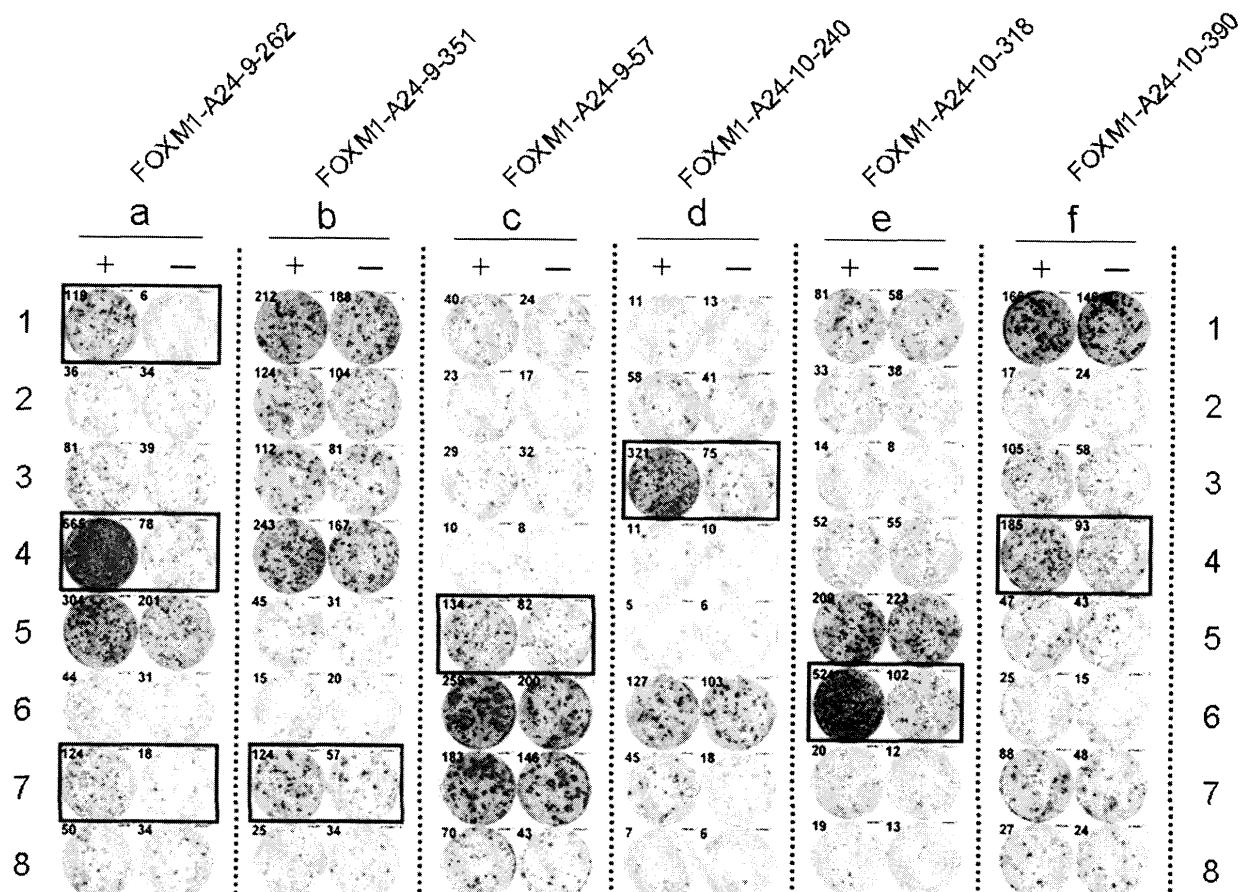
21

<210> 38
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственный

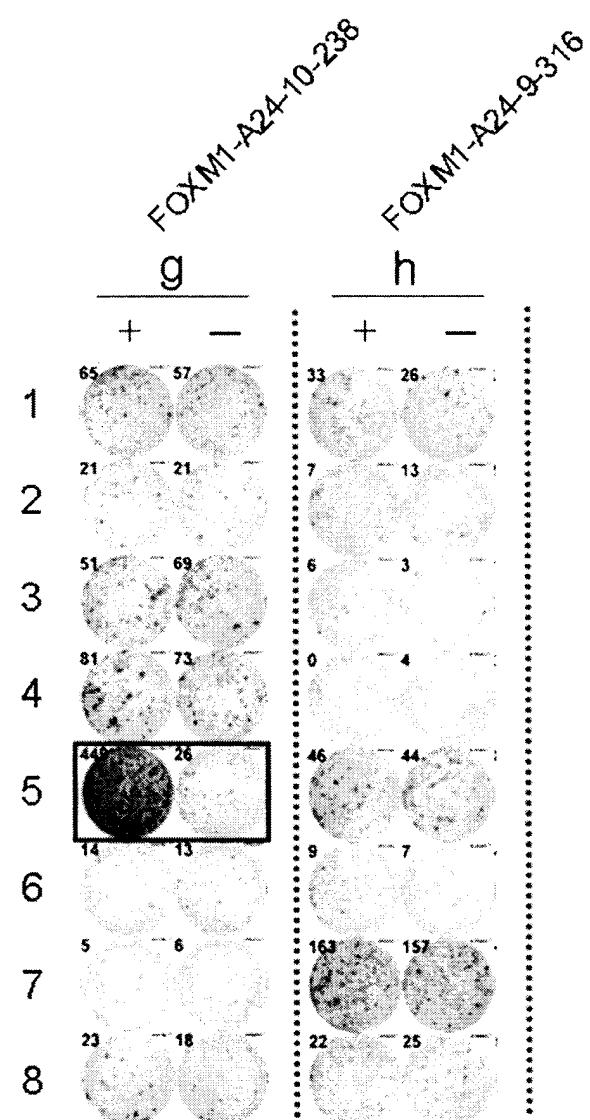
<220>
<223> Искусственная последовательность

<400> 38
ctagcctctg gaatcctttc tctt

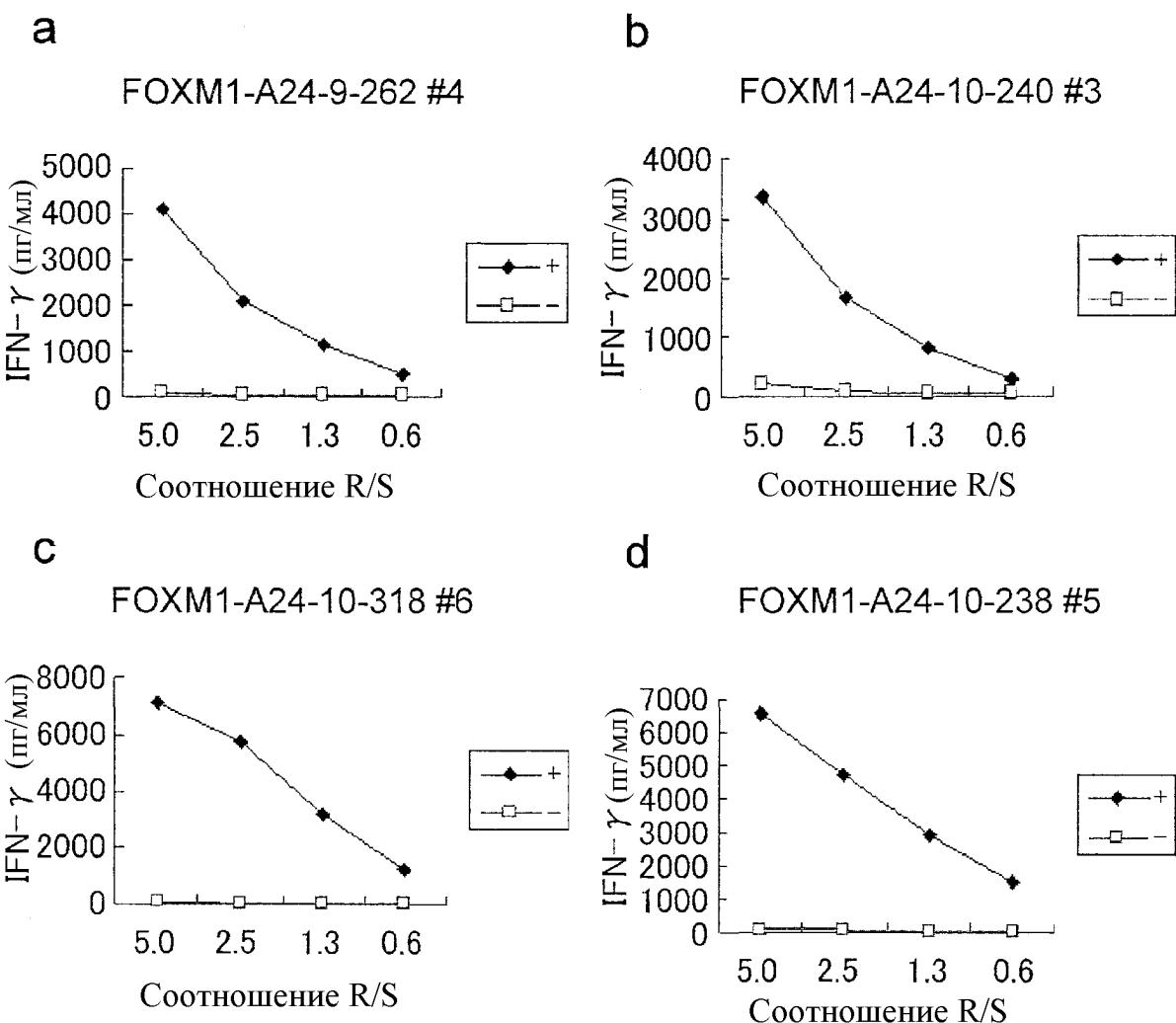
24



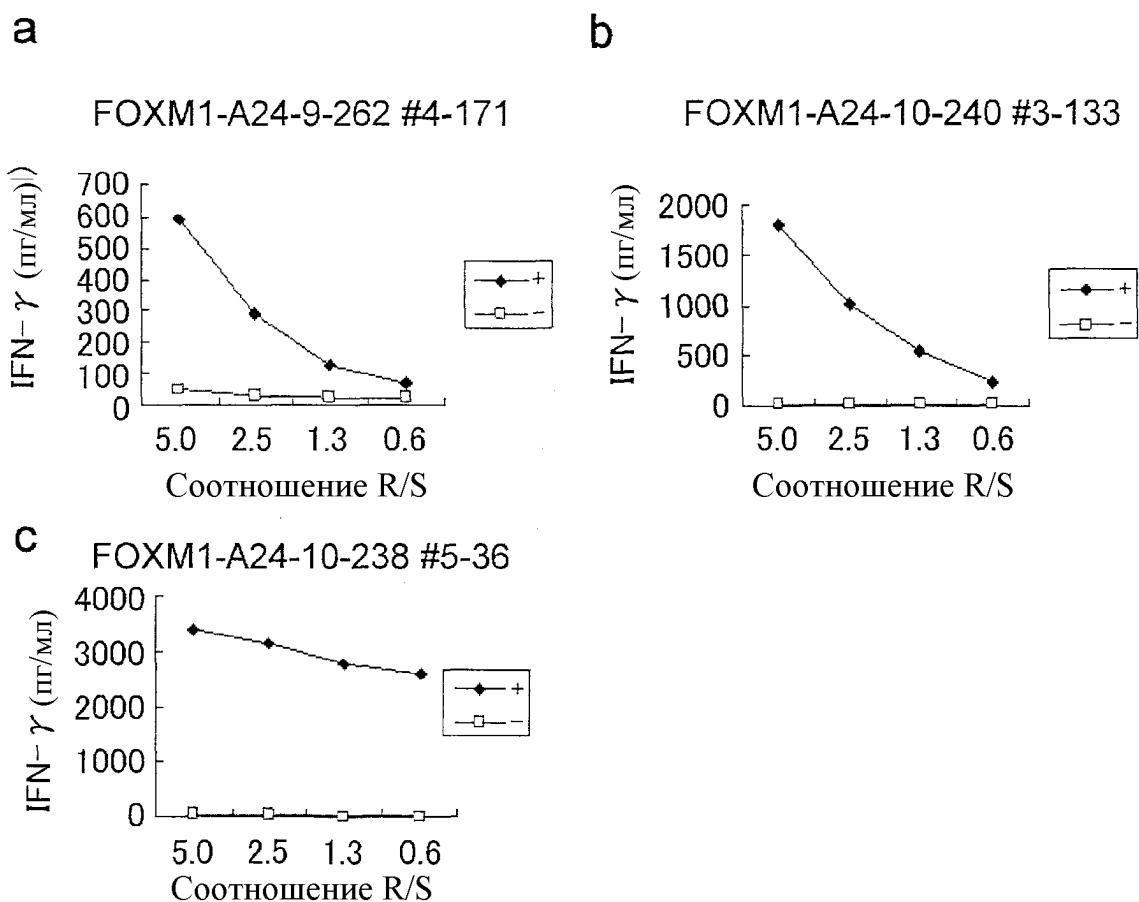
Фиг.1 а-ф



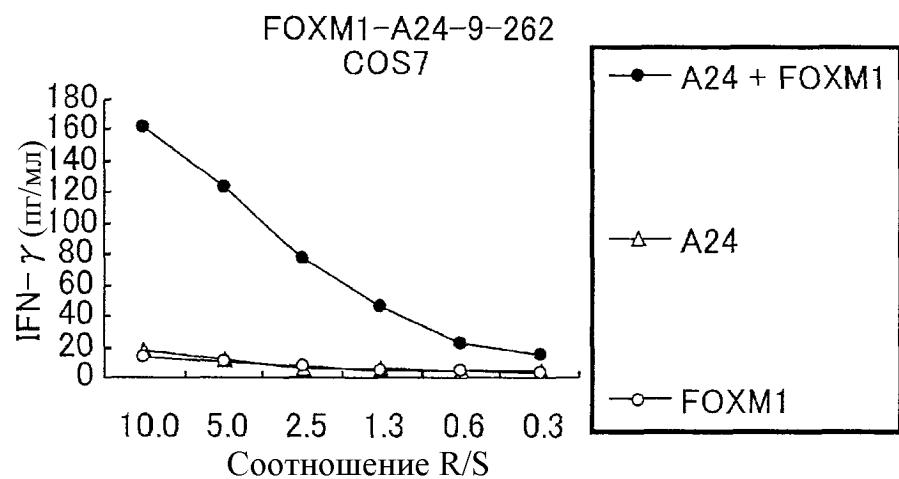
Фиг.1g-h



Фиг.2



Фиг.3



Фиг.4