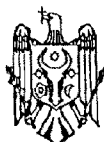




MD/EP 3388075 T2 2023.10.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3388075 (13) T2

(51) Int. Cl.: A61K 39/00 (2006.01.01)
C07K 14/47 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2018 0992 (22) Data de depozit: 2016.03.24 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 18174251.1, 2016.03.24 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3388075, 2018.10.17 (31) Numărul cererii prioritare: 201562139189 P; 201505305 (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2015.03.27; 2015.03.27 (33) Țara cererii prioritare: US; GB	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 10/2023, 2023.10.31 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 21/2023, 2023.05.24 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 11/2018, 2018.11.30
(71) Solicitant: IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH, DE (72) Inventatori: MAHR Andrea, DE; STEVERMANN Lea, DE; WEINSCHENK Toni, DE; SCHOOR Oliver, DE; FRITSCH Jens, DE; SINGH Harpreet, DE (73) Titular: IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH, DE (74) Mandatar autorizat: FOCȘA Valentin	

(54) Noi peptide și combinații de peptide pentru utilizare în imunoterapia împotriva unor diverse tumori (SEQ ID 25 - MXRA5-003)

(57) Rezumat:

1

Prezenta invenție se referă la peptide, proteine, acizi nucleici și celule pentru utilizare în metode imunoterapeutice. În particular, prezenta invenție se referă la imunoterapia împotriva cancerului. În plus, prezenta invenție se referă la epitopii peptidici ai unei celule T asociate tumorii, singuri sau asociați cu alte peptide asociate tumorii, care pot servi, de exemplu, drept ingrediente farmaceutice active ale compozițiilor de vaccinuri care stimulează răspunsurile imunitare antitumorale sau pentru

2

stimularea celulelor T *ex vivo* și transferarea la pacienți. Peptidele legate de moleculele complexului major de histocompatibilitate (MHC), sau peptidele ca atare, pot fi, de asemenea, ținte ale anticorpilor, ale receptorilor solubili de celule T și ale altor molecule de legare.

Secvențe: 290

Revendicări: 14

Figuri: 7

MD/EP 3388075 T2 2023.10.31

**(54) Novel peptides and combination of peptides for use in immunotherapy
against various tumors (SEQ ID 25 - MXRA5-003)**

(57) Abstract:

1

The present invention relates to peptides, proteins, nucleic acids and cells for use in immunotherapeutic methods. In particular, the present invention relates to the immunotherapy of cancer. The present invention furthermore relates to tumor-associated T-cell peptide epitopes, alone or in combination with other tumor-associated peptides that can for example serve as active pharmaceutical ingredients of vaccine

2

compositions that stimulate anti-tumor immune responses, or to stimulate T cells ex vivo and transfer into patients. Peptides bound to molecules of the major histocompatibility complex (MHC), or peptides as such, can also be targets of antibodies, soluble T-cell receptors, and other binding molecules.

Sequences: 290

Claims: 14

Fig.: 7

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)**

Prezenta invenție se referă la peptide, proteine, acizi nucleici și celule pentru utilizare în metode imunoterapeutice. În particular, prezenta invenție se referă la imunoterapia împotriva cancerului. În plus, prezenta invenție se referă la epitopii peptidici ai unei celule T asociate tumorii, singuri sau asociați cu alte peptide asociate tumorii, care pot servi, de exemplu, drept ingrediente farmaceutice active ale compozițiilor de vaccinuri care stimulează răspunsurile imunitare antitumorale sau pentru stimularea celulelor T *ex vivo* și transferarea la pacienți. Peptidele legate de moleculele complexului major de histocompatibilitate (MHC), sau peptidele ca atare, pot fi, de asemenea, ținte ale anticorpilor, ale receptorilor solubili de celule T și ale altor molecule de legare.

Prezenta invenție se referă la mai multe secvențe noi de peptide și variantele lor derivate din molecule HLA de clasă I ale celulelor tumorale umane care pot fi utilizate în compoziții de vaccinuri pentru stimularea răspunsurilor imunitare antitumorale sau ca ținte pentru dezvoltarea de compuși și celule active din punct de vedere farmaceutic/imunologic.

FUNDAMENTELE INVENȚIEI

Potrivit Organizației Mondiale a Sănătății (OMS), în 2012, cancerul se număra printre cele patru mari boli mortale netransmisibile la nivel mondial. În același an, cancerul colorectal, cancerul de glandă mamară și cancerul de tract respirator au fost enumerate printre primele 10 cauze de deces în țările cu venituri ridicate (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>).

Epidemiologie

În 2012, la nivel mondial au fost estimate 14,1 milioane de cazuri noi de cancer, 32,6 milioane de pacienți care suferă de cancer (în interval de 5 ani de la diagnosticare) și 8,2 milioane de decese cauzate de cancer (Ferlay et al., 2013; Bray et al., 2013).

În cadrul grupurilor de cancer cerebral, leucemie și cancer pulmonar, prezenta descriere se concentrează în special pe glioblastom (GB), leucemie limfocitară cronică (CLL) și leucemie mieloidă acută (AML), cancer pulmonar non-microcelular (NSCLC) și, respectiv, microcelular (SCLC).

GB este cea mai frecventă afecțiune malignă a sistemului nervos central, cu o rată de incidență ajustată în funcție de vârstă de 3,19 la 100.000 de locuitori în Statele Unite. GB are un prognostic foarte slab, cu o rată de supraviețuire la un an de 35% și o rată de supraviețuire la 5 ani mai mică de 5%. Sexul masculin, vârsta înaintată și etnia par a fi factori de risc pentru GB (Thakkar et al., 2014).

CLL este cea mai frecventă leucemie în lumea occidentală, unde reprezintă aproximativ o treime din totalul leucemiilor. Ratele de incidență sunt similare în SUA și în Europa, iar cazurile noi sunt estimate la aproximativ 16.000 pe an. CLL este mai frecvent la caucazieni decât la africani, mai rar la hispanici și la nativii americani și foarte rar la asiatici. La persoanele de origine asiatică, ratele de incidență a CLL sunt de 3 ori mai mici decât la caucazieni (Gunawardana et al., 2008). Supraviețuirea generală la cinci ani pentru pacienții cu CLL este de aproximativ 79% (<http://www.cancer.net/cancer-types/leukemia-chronic-lymphocytic-cll/statistics>).

Cancerul pulmonar este cel mai frecvent tip de cancer la nivel mondial și principala cauză de deces prin cancer în multe țări. Cancerul pulmonar este subîmpărțit în cancer pulmonar microcelular și cancer pulmonar non-microcelular. NSCLC include tipurile histologice adenocarcinom, carcinom cu celule scuamoase și carcinom cu celule mari și reprezintă 85% din toate cancerurile pulmonare din Statele Unite. Incidența NSCLC este strâns corelată cu prevalența fumatului, incluzând fumătorii actuali și foștii fumători, iar rata de supraviețuire la cinci ani a fost raportată la 15% (World Cancer Report, 2014; Molina et al., 2008).

TerapieCancer de glandă mamară

Tratamentul standard pentru pacientele cu cancer de glandă mamară depinde de diferiți parametri: stadiul tumorii, statutul receptorilor hormoni și modelul de exprimare al HER2. Standardul de tratament include rezecția chirurgicală completă a tumorii, urmată de radioterapie. Chimioterapia, în principal cu antracicline și taxani, poate fi începută înainte sau după rezecție. Pacientele cu tumori HER2- pozitive primesc anticorpul anti-HER2 trastuzumab în plus față de chimioterapice (S3-Leitlinie Mammarkarzinom, 2012). Cancerul de glandă mamară este o entitate oncologică imunogenă, iar diferitele tipuri de celule imune infiltrate în tumorile primare prezintă o semnificație prognostică și predictivă distinctă. Un număr mare de studii de imunoterapie în fază incipientă au fost efectuate la paciente cu cancer de glandă mamară. Sunt în curs de apariție date clinice privind efectele modulării punctelor de control imunitar cu ipilimumab și alți anticorpi activatori ai celulelor T la pacientele cu cancer de glandă mamară (Emens, 2012).

Leucemie limfocitară cronică

Deși LLC nu este vindecabil în prezent, mulți pacienți prezintă doar o evoluție lentă a bolii sau o agravare a simptomelor. Pentru pacienții cu boală simptomatică sau cu evoluție rapidă, sunt disponibile mai multe opțiuni de tratament. Printre acestea se numără chimioterapia, terapia țintită, terapiile pe bază imunitară, cum ar fi anticorpii monoclonali, receptori himerici de antigen (CAR) și imunoterapia activă, precum și transplanturile de celule stem.

Mai multe studii finalizate și în curs de desfășurare se bazează pe celule T autologe modificate cu receptor chimeric de antigen (CAR) cu specificitate CD19 (Maus et al., 2014). Până în prezent, doar o minoritate de pacienți au prezentat CAR detectabili sau persistenți. Un răspuns parțial (PR) și două răspunsuri complete (CR) au fost detectate în studiile cu celule CAR T efectuate de Porter et al. și Kalos et al. (Kalos et al., 2011; Porter et al., 2011).

Imunoterapia activă include următoarele strategii: terapia genică, vaccinuri cu celule tumorale modificate integral, vaccinuri pe bază de DC și vaccinuri peptidice derivate din antigenul asociat tumorii (TAA).

Mai multe TAA-uri sunt supraexprimate în CLL și sunt potrivite pentru vaccinare. Printre acestea se numără fibromodulina (Mayr et al., 2005), RHAMM/CD168 (Giannopoulos et al., 2006), MDM2 (Mayretal., 2006), hTERT (Counter et al., 1995), proteina receptoare de laminină imatură a antigenului oncofetal (OFAiLRP) (Siegel et al., 2003), adipofilina (Schmidt et al., 2004), survivina (Granziero et al., 2001), KW1 până la KW14 (Krackhardt et al., 2002) și regiunea IgVHCDR3 derivată din tumori (Harig et al., 2001; Carballido et al., 2012). Un studiu clinic de fază I a fost efectuat folosind peptida R3 derivată din RHAMM ca vaccin. 5 din 6 pacienți au avut răspunsuri detectabile ale celulelor T CD8+ specifice R3 (Giannopoulos et al., 2010).

Cancer colorectal

În funcție de stadiul în care se află cancerul colorectal (CRC), sunt disponibile diferite terapii standard pentru cancerul de colon și rectal. Procedurile standard includ chirurgia, radioterapia, chimioterapia și terapia țintită pentru CRC (Berman et al., 2015a; Berman et al., 2015b).

Cele mai recente studii clinice analizează imunoterapia activă ca opțiune de tratament împotriva CRC. Aceste strategii includ vaccinarea cu peptide din antigeni asociați tumorilor (TAA-uri), celule tumorale întregi, vaccinuri cu celule dendritice (DC) și vectori virali (Koido et al., 2013).

Până în prezent, vaccinurile peptidice au fost direcționate împotriva antigenului carcinoembrionar (CEA), mucinei 1, EGFR-ului, antigenului carcinomului cu celule scuamoase recunoscut de celulele T 3 (SART3), beta-gonadotropinei corionice umane (beta-hCG), antigenului 1 al tumorii Wilms (WT1), Survivin-2B, MAGE3, p53, proteinei 43 de tip „deget inelar” și translocazei membranei mitocondriale exterioare 34 (TOMM34) sau KRAS-ului mutant. În mai multe studii clinice de fază I și II, pacienții au prezentat răspunsuri CTL specifice antigenului sau producție de anticorpi. În contrast cu răspunsurile imunologice, numeroși pacienți nu au avut beneficii la nivel clinic în urma vaccinurilor peptidice (Koido et al., 2013; Miyagi et al., 2001; Moulton et al., 2002; Okuno et al., 2011).

Vaccinurile cu celule dendritice cuprind DC-uri pulsate fie cu peptide derivate din TAA, fie cu lizate de celule tumorale, fie cu celule tumorale apoptotice, fie cu ARN tumoral sau cu produse de fuziune de celule DC-tumorale. Deși mulți pacienți din studiile de fază I/II au prezentat răspunsuri imunologice specifice, doar o minoritate a avut un beneficiu clinic (Koido et al., 2013).

Cancer esofagian

Strategia de tratament primar pentru cancerul esofagian depinde de stadiul și localizarea tumorii, de tipul histologic și de starea medicală a pacientului. Regimurile chimioterapeutice includ oxaliplatină plus fluorouracil, carboplatină plus paclitaxel, cisplatină plus fluorouracil, FOLFOX și cisplatină plus irinotecan. Pacienții cu tumori HER2-pozitive ar trebui să fie tratați în conformitate cu orientările pentru cancerul gastric, deoarece datele randomizate pentru terapiile țintite în cancerul esofagian sunt foarte limitate (Stahl et al., 2013).

Datele privind abordările imunoterapeutice în cancerul esofagian sunt puține, deoarece a fost realizat doar un număr foarte limitat de studii clinice în fază incipientă. Un vaccin alcătuit din trei peptide derivate din trei antigeni diferiți ai cancerului testicular (protein kinaza TTK, antigenul limfatic 6 complex locus K și proteina 3 de legare a ARNm-ului factorului de creștere asemănător insulinei (IGF)-II) a fost administrat pacienților cu cancer esofagian avansat într-un studiu de fază I, cu rezultate moderate. Injectarea intratumorală de celule T activate după provocarea *in vitro* cu celule maligne autologe a provocat răspunsuri tumorale complete sau parțiale la patru din unsprezece pacienți într-un studiu de fază I/II (Toomey et al., 2013).

Cancer gastric

Cancerul gastric (GC) începe în celulele care căptușesc stratul mucozal și se răspândește prin straturile exterioare pe măsură ce crește. Sunt utilizate patru tipuri de tratament standard. Tratamentul

pentru cancerul gastric poate implica rezecție endoscopică sau chirurgicală, chimioterapie, radioterapie sau chimioradioterapie (Leitlinie Magenkarzinom, 2012).

Eficacitatea regimurilor terapeutice actuale pentru GC avansat este slabă, ceea ce duce la rate scăzute de supraviețuire la 5 ani. Imunoterapia ar putea fi o abordare alternativă pentru ameliorarea supraviețuirii pacienților cu GC. Transferul adoptiv de limfocite asociate tumorii și de celule killer induse de citokine, vaccinurile pe bază de peptide care țințesc HER2/neu, MAGE-3 sau receptorii 1 și 2 ai factorului de creștere endotelială vasculară și vaccinurile pe bază de celule dendritice care țințesc HER2/neu au prezentat rezultate promițătoare în studiile clinice de GC. Inhibarea punctului de control imunitar și celulele T modificate ar putea reprezenta opțiuni terapeutice suplimentare, care sunt evaluate în prezent în studii preclinice și clinice (Matsueda și Graham, 2014).

Glioblastom

Opțiunile terapeutice pentru glioblastom (gradul IV OMS) sunt foarte limitate. Diferite abordări imunoterapeutice sunt investigate pentru tratamentul GB, inclusiv inhibarea punctului de control imunitar, vaccinarea și transferul adoptiv de celule T modificate.

În prezent, sunt investigate diferite strategii de vaccinare pentru pacienții cu GB, inclusiv vaccinuri pe bază de peptide, vaccinuri pe bază de proteine de șoc termic, vaccinuri autologe pe bază de celule tumorale, vaccinuri pe bază de celule dendritice și vaccinuri pe bază de proteine virale. În aceste abordări, peptidele derivate din proteinele asociate cu GB, cum ar fi varianta III a receptorului factorului de creștere epidermică (EGFRvIII), proteinele de șoc termic sau celulele dendritice pulsate cu lizat de celule tumorale autologe sau componente ale citomegalovirusului sunt aplicate pentru a induce un răspuns imunitar antitumoral la pacienții cu GB. Mai multe dintre aceste studii relevă profiluri bune de siguranță și tolerabilitate, precum și date promițătoare privind eficacitatea.

Transferul adoptiv de celule T modificate genetic reprezintă o abordare imunoterapeutică suplimentară pentru tratamentul GB-ului. Diferite studii clinice evaluează în prezent siguranța și eficacitatea celulelor T purtătoare de receptori de antigen himeric direcționate împotriva HER2, a receptorului IL-13 alfa 2 și a EGFRvIII (Ampie et al., 2015).

Cancer hepatic

Gestionarea bolii depinde de stadiul tumorii la momentul diagnosticului și de starea generală a ficatului. Chimioterapia împotriva HCC-ului include combinații de doxorubicină, 5-fluorouracil și cisplatină pentru terapia sistemică și doxorubicină, floxuridină și mitomicină C pentru perfuzii în artera hepatică. Cu toate acestea, majoritatea HCC-urilor prezintă o rezistență ridicată la chimioterapie (Enguita-German și Fortes, 2014).

Opțiunile terapeutice în HCC avansat nerezecabil sunt limitate la Sorafenib, un inhibitor de multitirozin kinază (Chang et al., 2007; Wilhelm et al., 2004). Sorafenibul este singurul medicament sistemic care a confirmat creșterea supraviețuirii cu aproximativ 3 luni și reprezintă în prezent singura opțiune de tratament experimental pentru acești pacienți (Chapiro et al., 2014; Llovet et al., 2008).

În ultima vreme, au fost efectuate un număr limitat de studii de imunoterapie pentru HCC. Citokinele au fost utilizate pentru a activa subseturi de celule imune și/sau pentru a crește imunogenitatea tumorală (Reinisch et al., 2002; Sangro et al., 2004). Alte studii s-au axat pe infuzarea de limfocite care infiltrază tumorile sau de limfocite activate din sânge periferic (Shi et al., 2004; Takayama et al., 1991; Takayama et al., 2000).

Până în prezent, au fost efectuate un număr mic de teste de vaccinare terapeutică. Butterfield et al. au efectuat două studii folosind peptide derivate din alfa-fetoproteina (AFP) ca vaccin sau DC-uri încărcate cu peptide AFP *ex vivo* (Butterfield et al., 2003; Butterfield et al., 2006). În două studii diferite, celulele dendritice (DC-uri) autologe au fost pulsate *ex vivo* cu un lizat de tumoră autologă (Lee et al., 2005) sau cu un lizat al liniei celulare de hepatoblastom HepG2 (Palmer et al., 2009). Până în prezent, studiile de vaccinare au arătat doar îmbunătățiri limitate în ceea ce privește rezultatele clinice.

Melanom

Terapia standard în melanom este rezecția chirurgicală completă cu țesut sănătos din jur. Opțiunile terapeutice includ monochimioterapia, polichimioterapia și terapiile țințite cu inhibitori specifici (S3-Leitlinie Melanom, 2013).

Mai multe abordări diferite de vaccinare au fost deja evaluate la pacienții cu melanom avansat. Până în prezent, studiile de fază III au dat rezultate mai degrabă dezamăgitoare, iar strategiile de vaccinare trebuie în mod clar îmbunătățite. Prin urmare, noile studii clinice, cum ar fi studiul OncoVEX GM-CSF sau studiul DERMA, au ca scop îmbunătățirea eficacității clinice fără a reduce tolerabilitatea (<http://www.cancerresearchuk.org>).

Transferul adoptiv de celule T este foarte promițător pentru tratamentul melanomului în stadiu avansat. Limfocitele autologe infiltrate în tumori expandate *in vitro*, precum și celulele T care adăpostesc un receptor de celule T cu afinitate ridicată pentru antigenul NY-ESO-1 al cancerului testicular au avut

efecte benefice semnificative și efecte toxice reduse în urma transferului la pacienții cu melanom. Din nefericire, celulele T cu receptori de celule T cu afinitate mare pentru antigenii specifici melanocitelor MART1 și gp100 și pentru antigenul cancerului testicular MAGEA3 au indus efecte toxice considerabile în studiile clinice. Astfel, transferul adoptiv de celule T are un potențial terapeutic ridicat, dar siguranța și tolerabilitatea acestor tratamente trebuie să fie în continuare îmbunătățite (Phan și Rosenberg, 2013; Hinrichs și Restifo, 2013).

Cancer pulmonar non-microcelular

Opțiunile de tratament sunt stabilite în funcție de tipul de cancer (microcelular sau non-microcelular) și stadiul cancerului, și pot include chirurgia, radioterapia, chimioterapia și bioterapiile biologice țintite, cum ar fi cele cu bevacizumab, erlotinib și gefitinib (S3-Leitlinie Lungenkarzinom, 2011).

Pentru a extinde opțiunile terapeutice pentru NSCLC, diferite abordări imunoterapeutice au fost studiate sau sunt încă în curs de investigare. În timp ce vaccinarea cu L-BLP25 sau MAGEA3 nu a reușit să demonstreze un avantaj de supraviețuire mediat de vaccin la pacienții cu NSCLC, un vaccin derivat din linia celulară alogenă a prezentat rezultate promițătoare în studiile clinice. În plus, în prezent sunt în curs de desfășurare alte studii de vaccinare care vizează ganglioizidele, receptorul factorului de creștere epidermică și alți câțiva antigeni. O strategie alternativă pentru sporirea răspunsului celulelor T anti-tumorale ale pacientului constă în blocarea receptorilor celulelor T inhibitoare sau a liganzilor acestora cu anticorpi specifici. Potențialul terapeutic al câtorva dintre acești anticorpi, inclusiv ipilimumabul, nivolumabul, pembrolizumabul, MPDL3280A și MEDI-4736 în NSCLC este evaluat în prezent în cadrul unor studii clinice (Reinmuth et al., 2015).

Cancer ovarian

Rezecția chirurgicală este terapia primară în cazul carcinomului ovarian atât în stadii incipiente, cât și în stadii avansate (S3-Leitlinie maligne Ovarialtumore, 2013).

Imunoterapia pare a fi o strategie promițătoare pentru îmbunătățirea tratamentului pacientelor cu cancer ovarian, deoarece prezența limfocitelor proinflamatorii infiltrante tumorale, în special a celulelor T CD8-pozitive, se corelează cu un prognostic bun, iar celulele T specifice pentru antigenii asociați tumorii pot fi izolate din țesutul canceros.

Prin urmare, se depun numeroase eforturi științifice pentru investigarea diferitelor imunoterapii în cancerul ovarian. A fost deja efectuat un număr considerabil de studii preclinice și clinice, iar alte studii sunt în curs de desfășurare. Sunt disponibile date clinice privind terapia cu citokine, vaccinarea, tratamentul cu anticorpi monoclonali, transferul adoptiv de celule și imunomodularea.

Studiile de vaccinare de fază I și II, care utilizează peptide singulare sau multiple, derivate din mai multe proteine asociate tumorilor (Her2/neu, NY-ESO-1, p53, tumoare Wilms-1) sau antigeni tumoralii întregi, derivate din celule tumorale autologe, au evidențiat profiluri bune de siguranță și tolerabilitate, însă numai efecte clinice slabe sau moderate.

Transferul adoptiv de celule imunitare a obținut rezultate eterogene în studiile clinice. Transferul adoptiv de celule T autologe, extinse *in vitro*, care infiltrează tumorile, s-a dovedit a fi o abordare promițătoare într-un studiu pilot. În schimb, transferul de celule T care adăpostesc un receptor de antigen himeric specific pentru receptorul alfa al folatului nu a indus un răspuns clinic semnificativ într-un studiu de fază I. S-a demonstrat că celulele dendritice pulsate cu lizat de celule tumorale sau cu proteine asociate tumorilor *in vitro* sporesc răspunsul antitumoral al celulelor T în urma transferului, însă gradul de activare a celulelor T nu a fost corelat cu efectele clinice. Transferul de celule natural killer a provocat toxicități semnificative într-un studiu de fază II.

Imunitatea antitumorală intrinsecă, precum și imunoterapia sunt perturbate de un micromediu tumoral imunosupresiv. Pentru a depăși acest obstacol, medicamentele imunomodulatoare, cum ar fi ciclofosfamida, anticorpii anti-CD25 și doxorubicina lipozomală pegilată sunt testate în combinație cu imunoterapia. Cele mai fiabile date sunt disponibile în prezent pentru ipilimumab, un anticorp anti-CTLA4, care îmbunătățește activitatea celulelor T. Ipilimumabul s-a dovedit a exercita efecte antitumorale semnificative la pacientele cu cancer ovarian (Mantia-Smaldone et al., 2012).

Cancer pancreatic

Opțiunile terapeutice pentru pacienții cu cancer pancreatic sunt foarte limitate. O problemă majoră pentru un tratament eficient este reprezentată de obicei de stadiul avansat al tumorii în momentul diagnosticului.

Strategiile de vaccinare sunt studiate ca o alternativă inovatoare și promițătoare pentru tratamentul cancerului pancreatic. Vaccinurile pe bază de peptide care vizează mutațiile KRAS, telomeraza reactivă, gastrina, survivina, CEA și MUC1 au fost deja evaluate în studiile clinice, parțial cu rezultate promițătoare. În plus, testele clinice pentru vaccinurile pe bază de celule dendritice, vaccinurile alogene care secretă GM-CSF și algenpantucel-L la pacienții cu cancer pancreatic au evidențiat, de

asemenea, efectele benefice ale imunoterapiei. În prezent, sunt în curs de desfășurare studii clinice suplimentare care investighează în continuare eficiența diferitelor protocoale de vaccinare (Salman et al., 2013).

Cancer de prostată

Strategia terapeutică pentru cancerul de prostată depinde în principal de stadiul cancerului. Pentru cancerul de prostată nemetastazant restrâns la nivel local, opțiunile de tratament includ supravegherea activă (wait and watch), rezecția chirurgicală completă a prostatei și radioterapia locală cu doze mari cu sau fără brahiterapie (S3-Leitlinie Prostatakarzinom, 2014).

Vaccinul pe bază de celule dendritice sipuleucel-T a fost primul vaccin anticancer aprobat de FDA. Datorită efectului său pozitiv asupra supraviețuirii pacienților cu CRPC, se depun multe eforturi pentru dezvoltarea de noi imunoterapii. În ceea ce privește strategiile de vaccinare, vaccinul peptidic cu antigen specific prostatic (PSA)-TRICOM, vaccinul peptidic personalizat PPV, vaccinul ADN pTVG-HP și vaccinul cu celule întregi care exprimă GM-CSF GVAX au prezentat rezultate promițătoare în diferite studii clinice. În plus, s-a demonstrat că alte vaccinuri pe bază de celule dendritice, altele decât sipuleucel-T, și anume BPX-101 și DCVAC/Pa, au provocat răspunsuri clinice la pacienții cu cancer de prostată. Inhibitorii punctului de control imunitar, cum ar fi ipilimumabul și nivolumabul, sunt evaluați în prezent în studii clinice ca monoterapie, precum și în combinație cu alte tratamente, inclusiv terapia de deprivare de androgeni, radioterapia locală, PSA-TRICOM și GVAX. Substanța imunomodulatoare tasquinimod, care a încetinit semnificativ progresia și a crescut supraviețuirea fără progresie într-un studiu de fază II, este în prezent investigată în continuare într-un studiu de fază III. Lenalidomida, un alt imunomodulator, a produs efecte promițătoare în studiile clinice din faza inițială, dar nu a reușit să îmbunătățească supraviețuirea într-un studiu de fază III. În ciuda acestor rezultate dezamăgitoare, sunt în curs de desfășurare alte studii cu lenalidomidă (Quinn et al., 2015).

Carcinom cu celule renale

Tratamentul inițial constă cel mai frecvent în extirparea parțială sau completă a rinichiului (rinichilor) afectat (afecției) și rămâne pilonul principal al tratamentului curativ (Rini et al., 2008). Pentru tratamentul de primă linie al pacienților cu un scor de prognostic slab, un ghid elaborat de mai multe organizații și societăți de cancer recomandă inhibitorii receptorilor tirozin kinazei (TKI) sunitinib și pazopanib, anticorpii monoclonali bevacizumab combinat cu interferon- α (IFN- α) și inhibitorul mTOR temsirolimus. Pe baza orientărilor elaborate de NCCN din SUA, precum și de EAU și ESMO din Europa, TKI-urile sorafenib, pazopanib sau, mai recent, axitinib sunt recomandate ca terapie de linia a doua la pacienții cu RCC care au eșuat în terapia anterioară cu citokine (IFN- α , IL-2). Orientările NCCN recomandă, de asemenea, sunitinib în acest context (dovezi de nivel înalt în conformitate cu NCCN de categoria I).

Imunogenitatea cunoscută a RCC a reprezentat baza de susținere a utilizării imunoterapiei și a vaccinurilor împotriva cancerului în RCC-ul avansat. Corelația interesantă dintre exprimarea PD-1 a limfocitelor și stadiul avansat, gradul și prognosticul RCC-ului, precum și exprimarea selectivă a PD-L1 de către celulele tumorale ale RCC și asocierea sa potențială cu rezultate clinice mai proaste, au condus la dezvoltarea de noi agenți anti-PD-1/PD-L1, singuri sau în combinație cu medicamente anti-angiogenice sau alte abordări imunoterapeutice, pentru tratamentul RCC-ului (Massari et al., 2015). În cazul RCC-ului avansat, un studiu de fază III privind un vaccin împotriva cancerului, denumit TRIST, evaluează dacă TroVax (un vaccin care utilizează un antigen asociat tumorii, 5T4, cu un vector de virus al variolei), adăugat la tratamentul standard de primă linie, prelungește supraviețuirea pacienților cu RCC local avansat sau mRCC. Mediana supraviețuirii nu a fost atinsă în niciunul dintre grupuri, 399 de pacienți (54%) rămânând în studiu, însă analiza datelor confirmă rezultatele clinice anterioare, demonstrând că TroVax este activ din punct de vedere imunologic și că există o corelație între intensitatea răspunsului anticorpilor specifici 5T4 și îmbunătățirea supraviețuirii. În plus, există mai multe studii care caută vaccinuri peptidice care utilizează epitopi supraexpresiați în RCC.

Au fost investigate diverse abordări ale vaccinurilor tumorale. La pacienții cu RCC au fost efectuate studii care au utilizat abordări ale tumorii întregi, inclusiv lizate de celule tumorale, fuziuni de celule dendritice cu celule tumorale sau ARN al tumorii întregi, iar în unele dintre aceste studii au fost raportate remisiuni ale leziunilor tumorale (Avigan et al., 2004; Holtl et al., 2002; Marten et al., 2002; Su et al., 2003; Wittig et al., 2001).

Cancer pulmonar microcelular

Tratamentul și prognosticul SCLC depind în mare măsură de stadiul în care este diagnosticat cancerul. Stadializarea SCLC pe baza rezultatelor clinice este mai frecventă decât stadializarea patologică. Stadializarea clinică se bazează pe rezultatele examenului fizic, pe diferite teste imagistice și pe biopsii. Tratamentul chimioterapic standard al SCLC utilizează combinația de etopozid sau irinotecan cu cisplatină sau carboplatină (American Cancer Society, 2015; S3-Leitlinie Lungenkarzinom, 2011).

Imunoterapia reprezintă un domeniu excesiv de investigat în terapia împotriva cancerului. În tratamentul SCLC sunt folosite diferite abordări. Una dintre abordări vizează blocarea CTLA-4, un supresor imunitar uman natural. Inhibarea CTLA-4 urmărește stimularea sistemului imunitar pentru combaterea cancerului. Recent, a început dezvoltarea unor inhibitori promițători ai punctelor de control imunitar pentru tratamentul SCLC-ului. O altă abordare se bazează pe vaccinurile anticancerigene, care sunt disponibile în prezent pentru tratamentul SCLC-ului în cadrul studiilor clinice (American Cancer Society, 2015; National Cancer Institute, 2015).

Leucemie mieloidă acută

Tratamentul pentru LMA este împărțit în două faze: terapia de inducție și terapia post-remisiune/„terapia de consolidare”. Terapia de inducție este administrată pentru a induce remisiunea și constă în chimioterapie combinativă. Terapia de consolidare constă în chimioterapie suplimentară sau transplant de celule hematopoietice (HCT) (Showell și Levis, 2014).

Studiile clinice sunt recomandate pentru pacienții care fac parte din grupele de prognostic nefavorabil și intermediar-2. Opțiunile de tratament includ agenți hipometilcanți (HMA-uri) precum azacitidina sau decitabina, CPX-351, care este o formulă lipozomală de daunorubicină și citarabină într-un raport molar „optim” de 1:5, și volasertib, care este un inhibitor al polo-kinazelor. Volasertibul se administrează în asociere cu LDAC (citarabină în doze mici). În cazul mutațiilor FLT3 pot fi administrați mai mulți inhibitori FLT3 diferiți. Aceștia includ sorafenib, care se administrează în combinație cu 3+7, quizartinib, un inhibitor mai selectiv al FLT3 ITD care inhibă și CKIT, crenolanib și midostaurin, un inhibitor neselectiv al FLT3 ITD. O altă opțiune de tratament vizează CD33 cu conjugate anticorp-medicament (anti-CD33 + calechiamicină, SGN-CD33a, anti-CD33 + actiniu-225), anticorpi bispecfici (recunoașterea CD33 + CD3 (AMG 330) sau CD33 + CD16) și receptori de antigen himeric (CAR) (Estey, 2014).

Linfom non-Hodgkin

NHL-ul are peste 60 de subtipuri. Cele mai frecvente trei subtipuri sunt limfomul difuz cu celule B mari (DLBCL, cel mai frecvent subtip), limfomul folicular (FL, al doilea cel mai frecvent subtip) și limfomul limfocitar mic/limfomul limfocitar cronic (SLL/CLL, al treilea cel mai frecvent subtip). DLBCL, FL și SLL/CLL reprezintă aproximativ 85% din NHL (Li et al., 2015). Tratamentul NHL-ului depinde de tipul histologic și de stadiul în care se află (National Cancer Institute, 2015).

Regresia spontană a tumorii poate fi observată la pacienții cu limfom. Prin urmare, imunoterapia activă este o opțiune terapeutică (Palomba, 2012).

O opțiune importantă de vaccinare include vaccinurile Id. Limfocitele B exprimă imunoglobuline de suprafață cu o secvență specifică de aminoacizi în regiunile variabile ale lanțurilor lor grele și ușoare, unică pentru fiecare clonă celulară (= idiotip, Id). Idiotipul funcționează ca un antigen asociat tumorii.

Imunizarea activă include injectarea de proteină recombinantă (Id) conjugată cu un adjuvant (KLH), administrată împreună cu GM-CSF ca adjuvant imunitar. Id-ul specific tumorii este produs prin culturi de hibridomuri sau cu ajutorul tehnologiei ADN recombinant (plasmide) prin culturi de celule bacteriene, de insecte sau de mamifere.

Cancer uterin

Mai mult de 80% dintre cancerule endometriale apar sub formă de adenocarcinoame endometrioidale (tip I), o formă care este asociată cu expunerea la estrogeni și care este bine sau moderat diferențiată. Tratamentul carcinoamelor endometriale și al cancerelor de col uterin este dependent de stadiul în care se află (World Cancer Report, 2014).

Există, de asemenea, unele abordări imunoterapeutice care sunt în curs de testare. În cadrul unui studiu clinic de fază I/II, pacientele suferind de cancer uterin au fost vaccinate cu celule dendritice (DC) autologe electroporate cu ARNm al genei 1 a tumorii Wilms (WT1). În afară de un caz de reacție alergică locală la adjuvant, nu au fost observate efecte secundare adverse și 3 din 6 pacienți au prezentat un răspuns imunologic (Coosemans et al., 2013).

Adenocarcinom de vezică biliară și colangiocarcinom

Colangiocarcinomul (CCC) este dificil de tratat și este, de obicei, letal. Singura opțiune de tratament curativ este rezecția completă (R0). Eficacitatea terapiei biologice în cancerule tractului biliar a fost mixtă. Medicamentele care vizează creșterea vaselor de sânge, cum ar fi sorafenibul, bevacizumabul, pazopanibul și regorafenibul, sunt acum studiate pentru tratamentul CCC-ului. În plus, medicamentele care vizează EGFR-ul, cum ar fi cetuximabul și panitumumumabul, sunt utilizate în studii clinice în combinație cu chimioterapia (American Cancer Society, 2015). Pentru majoritatea medicamentelor testate până în prezent, controlul bolii și supraviețuirea generală nu au fost îmbunătățite în mod semnificativ, dar sunt în curs de desfășurare alte studii clinice.

Cancerul de vezică biliară (GBC) este cea mai frecventă și agresivă tumoare malignă a tractului biliar la nivel mondial. Din cauza rarității carcinoamelor tractului biliar în general, există doar câteva studii specifice privind GBC-ul sau CCC-ul, iar cele mai multe dintre ele includ toate cancerele tractului biliar. Acesta este motivul pentru care tratamentul nu s-a îmbunătățit în ultimele decenii, iar rezecția R0 este încă singura opțiune de tratament curativ.

Cancer de vezică urinară

Tratamentul standard pentru cancerul de vezică urinară include intervenții chirurgicale, radioterapie, chimioterapie și imunoterapie (National Cancer Institute, 2015).

O abordare imunoterapeutică eficientă este stabilită în tratamentul cancerului non-muscular invaziv agresiv al vezicii urinare (NMIBC). Astfel, se aplică o formă slăbită a bacteriei *Mycobacterium bovis* (*bacillus Calmette-Guérin* = BCG) sub formă de soluție intravezicală. Efectul major al tratamentului cu BCG este o protecție semnificativă pe termen lung (până la 10 ani) împotriva recidivei cancerului și o rată de progresie redusă. În principiu, tratamentul cu BCG induce un răspuns inflamator local care stimulează răspunsul imunitar celular. Răspunsul imunitar la BCG se bazează pe următoarele etape cheie: infectarea celulelor uroteliale și a celulelor canceroase vezicale de către BCG, urmată de o exprimare crescută a moleculelor prezentatoare de antigen, inducerea răspunsului imunitar mediat prin eliberarea de citokine, inducerea activității antitumorale prin implicarea diferitelor celule imunitare (limfocite T citotoxice, neutrofile, celule natural killer și macrofage) (Fuge et al., 2015; Gandhi et al., 2013).

Având în vedere efectele secundare severe și cheltuielile asociate cu tratamentul cancerului, este necesar să se identifice factorii care pot fi utilizați în tratamentul cancerului în general și al carcinomului hepatocelular (HCC), al carcinomului colorectal (CRC), al glioblastomului (GB), al cancerului gastric (GC), al cancerului esofagian, al cancerului pulmonar non-microcelular (NSCLC), al cancerului pancreatic (PC), al carcinomului cu celule renale (RCC), al hiperplaziei benigne de prostată (BPH), al cancerului de prostată (PCA), al cancerului ovarian (OC), al melanomului, al cancerului de glandă mamară, al leucemiei limfocitare cronice (CLL), al carcinomului cu celule Merkel (MCC), al cancerului pulmonar microcelular (SCLC), al limfomului non-Hodgkin (NHL), al leucemiei mieloide acute (AML), al cancerului de vezică biliară și colangiocarcinomului (GBC, CCC), al cancerului de vezică urinară (UBC) și al cancerului uterin (UEC), în special. De asemenea, este necesară identificarea factorilor care reprezintă biomarkeri pentru cancer, în general, și pentru tipurile de cancer menționate mai sus, în special, ceea ce duce la o diagnosticare mai bună a cancerului, la evaluarea prognosticului și la predicția succesului tratamentului.

Imunoterapia împotriva cancerului reprezintă o opțiune care vizează în mod specific celulele canceroase, reducând în același timp la minimum efectele secundare. Imunoterapia împotriva cancerului se folosește de existența antigenilor asociați tumorilor. Clasificarea curentă a antigenilor asociați tumorii (TAA) cuprinde următoarele grupuri principale:

a) Antigeni pentru cancer testicular: Primele TAA-uri identificate vreodată care pot fi recunoscute de către celulele T aparțin acestei clase, denumite inițial antigeni de cancer testicular (CT) deoarece exprimarea membrilor clasei se face în diferite tipuri histologice de tumori umane și, în țesuturile normale, are loc numai în spermatoците/spermatogoniile din testicul și, ocazional, din placenta. Deoarece celulele testiculare nu exprimă molecule HLA de clasă I și II, acești antigeni nu pot fi recunoscuți de celulele T în țesuturi normale și, prin urmare, se pot considera ca fiind din punct de vedere imunologic specifici tumorii. Exemple binecunoscute de antigeni CT sunt membrii familiei MAGE și NY-ESO-1.

b) Antigeni de diferențiere: Aceste TAA-uri sunt împărțite între tumori și țesutul normal din care provine tumoarea. Majoritatea antigenilor de diferențiere sunt identificați în melanoame și melanocite normale. Multe dintre aceste proteine derivate din melanocite sunt implicate în biosinteza melaninei și prin urmare nu sunt specifice tumorii, dar sunt totuși folosite pe scară largă pentru imunoterapia împotriva cancerului. Exemplele includ, fără a se limita la, tirozinază și melan-A/MART-1 pentru melanom sau PSA pentru cancer prostatic.

c) TAA-uri supraexprimate: Genele care codifică TAA exprimate larg au fost depistate în tipuri histologice diferite de tumori precum și în multe țesuturi normale, în general cu niveluri reduse de exprimare. Este posibil ca mulți dintre epitopii procesați și posibil prezentați de țesuturile normale să fie sub nivelul prag pentru recunoașterea de către celulele T, în timp ce supraexprimarea lor în celulele tumorale poate declanșa un răspuns anticanceros prin încălcarea toleranței stabilite anterior. Exemplele cunoscute pentru această clasă de TAA-uri sunt Her-2/neu, survivina, telomeraza și WT1.

d) Antigeni specifici tumorii: Aceste TAA-uri unice apar din mutații ale genelor normale (cum ar fi β -catenina, CDK4 etc.). Unele dintre aceste modificări moleculare sunt asociate cu transformări neoplazice și/sau progresie. Antigenii specifici tumorii sunt în general capabili să inducă un răspuns

imunitar puternic, fără a purta riscul unor reacții autoimune împotriva țesuturilor normale. Pe de altă parte aceste TAA-uri sunt în majoritatea cazurilor relevanți numai tumorii exacte din care au fost identificate și de obicei nu sunt comune mai multor tipuri individuale de tumori. Specificitatea tumorală (sau asocierea tumorală) a unei peptide poate apărea, de asemenea, dacă peptida provine dintr-un exon tumoral (asociat tumorii) în cazul proteinelor cu izoforme specifice tumorale (asociate tumorii).

e) TAA care apar prin modificări anormale post-tranlație: Aceste TAA-uri apar din proteine care nu sunt nici specifice, nici supraexprimate în tumori, dar care devin totuși asociate tumorii prin procese post-tranlaționale active în principal în tumori. Exemplele pentru aceste clase apar din tipare de glicozilare alterată, care duc la epitopi noi în tumori, cum ar fi pentru MUC1 sau evenimente de tip scindare a proteinei în timpul degradării, care pot sau nu să fie specifice tumorii.

f) Proteine oncovirale: Aceste TAA sunt proteine virale care pot juca un rol critic în procesul oncogen și acestea, deoarece sunt străine (nu au origine umană) pot evoca un răspuns al celulelor T. Exemple de astfel de proteine sunt proteinele papilomavirusului uman de tip 16, E6 și E7, care sunt exprimate în carcinomul cervicall.

Imunoterapia pe bază de celule T vizează epitopi peptidici derivați din proteine asociate sau specifice tumorii, care sunt prezentate de moleculele complexului major de histocompatibilitate (MHC). Antigenii care sunt recunoscuți de limfocitele T citotoxice specifice tumorii, adică epitopii acestora, pot fi molecule derivate din toate categoriile de proteine, cum sunt enzimele, receptorii, factorii de transcriere etc. care sunt exprimate și care, comparativ cu celulele nemodificate cu aceeași origine, de obicei sunt reglate ascendent în celulele respectivei tumorii.

Există două clase de molecule MHC, MHC de clasă I și MHC de clasă II. Moleculele MHC de clasă I sunt compuse dintr-un lanț alfa greu și beta-2-microglobulină, iar moleculele MHC de clasă II dintr-un lanț alfa și unul beta. Conformația lor tridimensională prezintă un șanț de legare care este folosit pentru interacțiuni necovalente cu peptide.

Moleculele MHC de clasă I pot fi găsite pe majoritatea celulelor nucleate. Ele prezintă peptide care rezultă din clivajul proteolitic al proteinelor predominant endogene, produse ribosomale defecte (DRIP-uri) și peptide mai mari. Totuși, proteinele derivate din compartimente endozomale sau surse exogene se regăsesc frecvent pe moleculele MHC de clasă I. Această modalitate non-clasică de prezentare a clasei I este cunoscută în literatură ca „prezentare încrucișată” (Brossart and Bevan, 1997; Rock et al., 1990). Moleculele MHC de clasă II se pot găsi numai pe celulele „profesioniste” prezentatoare de antigen (APC) și prezintă inițial peptidele unor proteine exogene sau transmembranare captate de APC-uri în timpul endocitozei și care sunt procesate ulterior.

Complexele de peptide și moleculele MHC de clasă I sunt recunoscute de limfocitele T citotoxice CD8-pozitive care poartă receptorul de celule T (TCR) adecvat, iar complexe peptidă – molecule MHC de clasă II sunt recunoscute de celulele T helper CD4-pozitive care poartă TCR-ul adecvat. Este bine cunoscut că TCR-ul, peptida și MHC-ul sunt astfel prezente în raport stoechiometric 1:1:1.

Celulele T CD4-pozitive joacă un rol important în inducerea și susținerea răspunsurilor efective de către celulele T citotoxice CD8-pozitive. Identificarea epitopilor celulelor T CD4-pozitive derivate din antigeni asociați tumorilor (TAA) are o mare importanță pentru dezvoltarea de produse farmaceutice care declanșează răspunsuri imunitare antitumorale (Gnjatic et al., 2003). La locul tumorii, celulele T helper susțin un mediu de citokine favorabile celulelor T citotoxice (CTL-favorabile) (Mortara et al., 2006) și atrag celule efectoare, de exemplu CTL, celule natural killer (NK), macrofage și granulocite (Hwang et al., 2007).

În absența inflamației, exprimarea moleculelor MHC de clasă II este limitată în principal la celulele sistemului imunitar, în special la celulele „profesioniste” prezentatoare de antigen (APC) cum ar fi monocitele, celulele derivate din monocite, macrofagele sau celulele dendritice. La pacienții cu cancer, s-a constatat că celulele tumorale exprimă molecule MHC de clasă II (Dengjel et al., 2006).

Peptidele elongate din descriere pot acționa ca epitopi activi ai MHC-ului de clasă II.

Celulele T helper, activate de epitopi ai MHC-ului de clasă II, joacă un rol important în orchestrarea funcției efectoare a CTL-urilor în imunitatea antitumorală. Epitopii celulelor T care declanșează un răspuns din partea celulelor T helper de tip TH1 susțin funcțiile efectorii ale celulelor T killer CD8-pozitive, care includ funcții citotoxice îndreptate împotriva celulelor tumorale care prezintă pe suprafața celulară complexe peptidă/MHC asociate tumorii. Astfel, epitopii peptidei unei celule T helper asociate tumorii, singure sau în combinație cu alte peptide asociate tumorii, poate servi ca ingredient farmaceutic activ al formulelor de vaccin care ar stimula răspunsul imunitar antitumoral.

S-a demonstrat pe modele animale (mamifere), de exemplu șoarece, că chiar și în absența limfocitelor T CD8-pozitive, celulele T-CD4 pozitive sunt suficiente pentru inhibarea manifestărilor tumorale prin inhibarea angiogenezei prin sinteza de interferon gamma (IFN γ) (Beatty and Paterson,

2001; Mumberg et al., 1999). Există dovezi că celulele T CD4 sunt efectori antitumorali direcți (Braumuller et al., 2013; Tran et al., 2014).

Deoarece exprimarea constitutivă a moleculelor HLA de clasă II este de obicei limitată la celulele sistemului imunitar, posibilitatea de izolare a peptidelor de clasă II direct din tumori primare nu a fost considerată anterior posibilă. Totuși, Dengjel et al. au reușit să identifice cu succes un număr de epitopi ai MHC-ului de clasă II direct din tumori (WO 2007/028574, EP 1 760 088 B1).

Deoarece ambele tipuri de răspuns, CD8 și CD4 dependente, contribuie împreună și sinergic la efectul antitumoral, identificarea și caracterizarea antigenilor asociați tumorii recunoscuți de CTL CD8+ (ligand: moleculă MHC de clasă I + epitop peptidă) sau celule T helper CD4-pozitive (ligand: moleculă MHC de clasă II + epitop peptidă) sunt importante în dezvoltarea de vaccinuri tumorale.

Pentru ca o peptidă MHC de clasă I să declanșeze (inducă) un răspuns imunitar celular, trebuie să se lege de o moleculă MHC. Acest proces depinde de alelele moleculei MHC și de polimorfismele specifice ale secvenței de aminoacizi ai peptidei. Peptidele care leagă MHC de clasă I au de obicei o lungime de 8-12 resturi de aminoacizi și conțin două resturi conservate („ancore”) în secvența acestora, care interacționează cu șanțul de legare corespunzătoare a moleculei MHC. Astfel, fiecare alelă de MHC are un „motiv de legare” care determină ce peptide se pot lega specific de șanțul de legare.

În reacția imunitară dependentă de MHC-ul de clasă I, peptidele nu numai că trebuie să fie capabile să se lege de anumite molecule MHC de clasă I exprimate de celulele tumorale, ci trebuie, de asemenea, să fie recunoscute ulterior de celulele T purtătoare de receptori specifici de celule T (TCR).

Pentru ca proteinele să fie recunoscute de limfocitele T ca antigeni specifici sau asociați tumorii și pentru a fi utilizați într-o terapie, trebuie îndeplinite anumite condiții prealabile. Antigenul ar trebuie să fie exprimat în principal de celulele tumorale și deloc, sau în cantități comparabil de mici, de țesuturile normale sănătoase. Într-o concretizare preferată, peptida trebuie să fie supraprezentată de celulele tumorale în comparație cu țesuturile normale sănătoase. De asemenea, este de dorit ca antigenul respectiv să fie prezent nu numai într-un tip de tumoare, ci și în concentrații ridicate (adică număr de copii ale peptidei respective per celulă). Antigenii specifici tumorii și asociați tumorii sunt adesea derivate din proteine implicate direct în transformarea unei celule normale într-o celulă tumorală datorită funcției lor, de exemplu în controlul ciclului celular sau suprimarea apoptozei. Suplimentar, țintele din aval pentru proteinele care cauzează direct transformarea pot fi reglate în sens crescător și prin urmare pot fi asociate indirect tumorii. Astfel de antigeni asociați indirect tumorii pot fi, de asemenea, ținte ale unei abordări de tip vaccinare (Singh-Jasuja et al., 2004). Este esențial ca epitopi să fie prezenți în secvența de aminoacizi a antigenului, pentru a se asigura că o astfel de peptidă („peptidă imunogenă”), derivată dintr-un antigen asociat unei tumori, conduce la un răspuns *in vitro* sau *in vivo* al celulelor T.

În principiu, orice peptidă capabilă să se lege la o moleculă MHC poate funcționa ca epitop al celulei T. Cerința prealabilă pentru inducerea unui răspuns al celulelor T, *in vivo* sau *in vitro*, este prezența unei celule T care are un TCR corespunzător și absența toleranței imunologice pentru acest anumit epitop.

Prin urmare, TAA-urile reprezintă un punct de plecare pentru dezvoltarea unei terapii bazate pe celule T, inclusiv, dar fără a se limita la vaccinuri anti-tumorale. Metodele pentru identificarea și caracterizarea TAA-urilor sunt bazate, de obicei, pe utilizarea de celule T care pot fi izolate de la pacienți sau subiecți sănătoși sau sunt bazate pe generarea de profiluri diferențiate sau tipare de exprimare diferențiate pentru peptide între tumori și țesuturi normale. Totuși, identificarea genelor supraexprimate în țesuturi tumorale sau linii celulare tumorale umane sau exprimate selectiv în astfel de țesuturi sau linii celulare, nu asigură informații precise asupra utilizării antigenilor care se transcriu din aceste gene într-un tratament imunitar. Acest lucru se datorează faptului că numai o subpopulație individuală de epitopi ai acestor antigeni este adecvată pentru o astfel de aplicație, deoarece trebuie să fie prezentă o celulă T cu un TCR corespunzător, iar toleranța imunologică pentru acest epitop specific trebuie să fie absentă sau minimă. Într-o concretizare foarte preferată a descrierii, este, prin urmare, important să se selecteze numai acele peptide supraprezentate sau selectiv prezentate împotriva cărora se poate găsi o celulă T funcțională și/sau o celulă T proliferantă. Astfel de celule T funcționale sunt definite ca celule T care, la stimularea cu un antigen specific, pot fi extinse clonal și sunt capabile să execute funcții efectoare („celule T efectoare”).

În cazul direcționării complexelor peptidă-MHC prin TCR-uri specifice (de exemplu, TCR-uri solubile) și anticorpi sau alte molecule de legare (schelete) în conformitate cu descrierea, imunogenitatea peptidelor subiacente este secundară. În aceste cazuri, prezentarea este factorul determinant.

W02015/018805A1 descrie o peptidă derivată din gena MXRA5 care se leagă de HLA- A*02, dar nu descrie o peptidă care cuprinde o secvență de aminoacizi din SEQ ID NO: 25 care are o lungime totală de 11 până la 16 aminoacizi.

Bassani-Sternberg et al. (2015) descriu spectrometria de masă de înaltă rezoluție pentru identificarea peptidelor care prezintă HLA asociate cu cancerul, dar nu divulgă o peptidă care cuprinde o secvență de aminoacizi din SEQ ID nr. 25 care are o lungime totală cuprinsă între 11 și 16 aminoacizi.

WO02/086443A2 descrie gena MXRA5 asociată cu cancerul, dar nu descrie o peptidă care să cuprindă o secvență de aminoacizi din SEQ ID NO: 25 care are o lungime totală cuprinsă între 11 și 16 aminoacizi.

REZUMATUL INVENȚIEI

Prezenta invenție se referă la o peptidă care cuprinde o secvență de aminoacizi din SEQ ID NO: 25, așa cum este definită în Revendicarea 1 anexată. Alte aspecte ale invenției sunt definite în revendicările anexate.

Într-un prim aspect, este descrisă o peptidă care cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul format din SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 288 sau o secvență variantă a acesteia care este cel puțin 77%, preferabil cel puțin 88%, omologă (preferabil cel puțin 77% sau cel puțin 88% identică) cu SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 288, în care varianta respectivă se leagă de MHC și/sau induce celule T care reacționează încrucișat cu peptida respectivă, sau o sare farmaceutică acceptabilă a acesteia, în care peptida respectivă nu este polipeptida de lungime completă care stă la baza acesteia.

În timp ce cel mai important criteriu pentru ca o peptidă să funcționeze ca țintă a terapiei împotriva cancerului este supraprezentarea acesteia în țesuturile tumorale primare în comparație cu țesuturile normale, profilul de exprimare a ARN-ului genei corespunzătoare poate ajuta la selectarea peptidelor adecvate. În special, unele peptide sunt greu de detectat prin spectrometrie de masă, fie din cauza proprietăților lor chimice, fie din cauza numărului lor scăzut de copii în celule, iar o abordare de screening axată pe detectarea prezentării peptidelor poate eșua în identificarea acestor ținte. Cu toate acestea, aceste ținte pot fi detectate printr-o abordare alternativă, începând cu analiza exprimării genelor în țesuturile normale și evaluând în al doilea rând prezentarea peptidelor și exprimarea genelor în tumori. Această abordare a fost realizată în această descriere folosind date de ARNm dintr-o bază de date disponibilă public (Lonsdale, 2013) în combinație cu alte date de exprimare genică (inclusiv eșantioane tumorale), precum și date de prezentare a peptidelor. Dacă ARNm-ul al unei gene este aproape absent în țesuturile normale, în special în sistemele de organe vitale, direcționarea peptidelor corespunzătoare, chiar și prin strategii foarte puternice (cum ar fi anticorpii bispecifici cu afinitate optimizată sau receptorii de celule T), este mai probabil să fie sigură. Astfel de peptide, chiar dacă sunt identificate doar într-un procentaj mic de țesuturi tumorale, reprezintă ținte interesante. Analiza de rutină prin spectrometrie de masă nu este suficient de sensibilă pentru a evalua acoperirea țintei la nivel peptidic. Mai degrabă, exprimarea ARNm-ului tumorii poate fi utilizată pentru a evalua acoperirea. Pentru detectarea peptidei în sine, ar putea fi necesară o abordare de spectrometrie de masă țintită, cu o sensibilitate mai mare decât în cazul screeningului de rutină, ceea ce ar putea duce la o mai bună estimare a acoperirii la nivelul prezentării peptidelor.

Este descrisă, de asemenea, o peptidă care cuprinde o secvență selectată din grupul format din SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 288 sau o variantă a acesteia care este cel puțin 77%, preferabil cel puțin 88%, omologă (preferabil cel puțin 77% sau cel puțin 88% identică) cu SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 288, în care respectiva peptidă sau varianta acesteia are o lungime totală cuprinsă între 8 și 100, preferabil între 8 și 30 și, cel mai preferabil, între 8 și 14 aminoacizi.

Tabelele de mai jos prezintă peptida conform prezentei descrieri, respectiv SEQ ID NO și gena sursă potențială (de bază) pentru această peptidă. Peptida din Tabelul 1 se leagă de HLA-A*02.

Tabelul 1: Peptidă în conformitate cu prezenta invenție

SEQ ID No.	Secvență	ID-uri gene	Simboluri oficiale ale genelor
25	LLWGHPRVALA	25878	MXRA5

Deosebit de preferate sunt peptidele – singure sau în combinație – în conformitate cu prezenta descriere, selectate din grupul format din SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 288 și utilizarea lor în imunoterapia carcinomului hepatocelular (HCC), a carcinomului colorectal (CRC), a glioblastomului (GB), a cancerului gastric (GC), a cancerului esofagian, a cancerului pulmonar non-microcelular (NSCLC), a cancerului pancreatic (PC), a carcinomului cu celule renale (RCC), a hiperplaziei benigne de prostată (BPH), a cancerului de prostată (PCA), a cancerului ovarian (OC), a melanomului, a cancerului de glandă mamară, a leucemiei limfocitare cronice (CLL), a carcinomului cu celule Merkel (MCC), a cancerului pulmonar microcelular (SCLC), a limfomului non-Hodgkin (NHL), a leucemiei mieloide acute (AML), a cancerului de vezică biliară și colangiocarcinomului (GBC, CCC), a cancerului de vezică urinară (UBC) și a cancerului uterin (UEC).

Cea mai preferată este peptida din SEQ ID NO: 25 (vezi Tabelul 1), precum și utilizările sale în imunoterapia pentru HCC, CRC, GB, GC, cancer esofagian, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, melanom, cancer de glandă mamară, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC și CLL.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la peptide, așa cum sunt descrise în prezentul document, care au capacitatea de a se lega de o moleculă a complexului major de histocompatibilitate (MHC) uman de clasă I sau – într-o formă elongată, cum ar fi o variantă de lungime – a MHC-ului de clasă II.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la peptidele descrise în prezentul document, în care peptidele (fiecare) constau sau constau în principal dintr-o secvență de aminoacizi conform SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 288.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la peptidele descrise în prezentul document, în care respectiva peptidă este modificată și/sau include legături non-peptidice.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la peptidele descrise în prezentul document, în care respectiva peptidă face parte dintr-o proteină de fuziune, în special fuzionată cu aminoacizii N-terminali ai lanțului invariant asociat cu antigenul HLA-DR (Ii) sau fuzionată cu (sau în secvența) unui anticorp, cum ar fi, de exemplu, un anticorp care este specific pentru celule dendritice.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la un acid nucleic care codifică peptidele descrise în prezentul document. Prezenta descriere se referă, de asemenea, la acidul nucleic conform descrierii, care este ADN, ADNc, ANP, ARN sau combinații ale acestora.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la un vector de exprimare capabil să exprime și/sau să exprime un acid nucleic așa cum este descris în prezentul document.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la o peptidă, așa cum este descrisă în în prezentul document, la un acid nucleic, așa cum este descris sau la un vector de exprimare, așa cum este descris în prezentul document, pentru utilizare în tratamentul bolilor și în medicină, în special în tratamentul cancerului.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la anticorpi care sunt specifici împotriva peptidelor descrise în prezentul document sau a complexelor dintre aceste peptide descrise în prezentul document și MHC, precum și la metode de obținere a acestora.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la receptori de celule T (TCR-uri), în special la TCR-uri solubile (sTCR-uri) și la TCR-uri clonate, modificate în celule T autologe sau alogene, precum și la metode de obținere a acestora, precum și la celulele NK sau la alte celule care poartă respectivele TCR-uri sau care reacționează încrucișat cu respectivele TCR-uri.

Anticorpii și TCR-urile sunt concretizări suplimentare ale utilizării imunoterapeutice a peptidelor conform prezentei descrieri.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la o celulă-gazdă care cuprinde un acid nucleic așa cum este descris în prezentul document sau un vector de exprimare așa cum a fost descris anterior. Prezenta descriere se referă, de asemenea, la celula-gazdă, așa cum este descrisă în prezentul document, care este o celulă prezentatoare de antigen și, de preferință, este o celulă dendritică.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la o metodă pentru producerea unei peptide, așa cum este descrisă în prezentul document, metoda respectivă cuprinzând cultivarea celulei-gazdă, așa cum este descris în prezentul document, și izolarea peptidei din celula-gazdă sau din mediul de cultură al acesteia.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la metoda descrisă în prezentul document, în care antigenul este încărcat pe molecule MHC de clasă I sau II exprimate pe suprafața unei celule prezentatoare de antigen adecvate sau a unei celule prezentatoare de antigen artificiale prin punerea în contact a unei cantități suficiente de antigen cu o celulă prezentatoare de antigen.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la metoda, așa cum este descrisă în prezentul document, în care celula prezentatoare de antigen cuprinde un vector de exprimare capabil să exprime sau care exprimă respectiva peptidă care conține de la SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 288, de preferință care conține de la SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 126, sau o variantă a secvenței de aminoacizi.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la celulele T activate, produse prin metoda descrisă în prezentul document, în care aceste celule T recunosc în mod selectiv o celulă care exprimă o polipeptidă care cuprinde o secvență de aminoacizi, așa cum este descrisă în prezentul document.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la o metodă de distrugere a celulelor-țintă la un pacient, celule-țintă care exprimă în mod aberant o polipeptidă care cuprinde orice secvență de aminoacizi, așa cum este descrisă în prezentul document, metoda cuprinzând administrarea la pacient a unui număr eficient de celule T produse așa cum este descris în prezentul document.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la utilizarea oricărei peptide descrise, a acidului nucleic descris în prezentul document, a vectorului de exprimare descris în prezentul document, a celulei descrise în prezentul document, a limfocitelor T activate, a receptorului de celule T sau a anticorpului ori

a altor molecule de legare a peptidelor și/sau a peptidelor la MHC descrise în prezentul document ca medicament sau la fabricarea unui medicament. De preferință, medicamentul respectiv este activ împotriva cancerului.

De preferință, medicamentul respectiv este adecvat și utilizat pentru o terapie celulară, un vaccin sau o proteină bazată pe un TCR sau un anticorp solubil.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la o utilizare așa cum este prezentată în prezentul document, în care celulele canceroase sunt HCC, CRC, GB, GC, cancer esofagian, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, melanom, cancer de glandă mamară, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC sau celule CLL.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la biomarkerii pe baza peptidelor descrise în prezentul document, numiți în în prezentul document „ținte”, care pot fi utilizați în diagnosticarea cancerului, de preferință HCC, CRC, GB, GC, cancer esofagian, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, melanom, cancer de sân, SCLC, NHL, AML, GBC, GBC, CCC, UBC, UEC și CLL. Markerul poate fi ori o supraprezentare a peptidei (peptidelor) în sine, ori o supraexprimare a genei (genelor) corespunzătoare. Markerii pot fi, de asemenea, utilizați pentru a prezice probabilitatea de succes a unui tratament, de preferință o imunoterapie și, cel mai preferabil, o imunoterapie care vizează aceeași țintă care este identificată de biomarker. De exemplu, un anticorp sau un TCR solubil poate fi utilizat pentru a colora secțiuni ale tumorii pentru a detecta prezența unei peptide de interes în complex cu MHC.

Opțional, anticorpul poartă o funcție efectoare suplimentară, cum ar fi un domeniu de stimulare imunitar sau o toxină.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la utilizarea acestor ținte noi în contextul tratamentului cancerului.

MXRA5 codifică una dintre proteinele asociate remodelării matricei, care conține 7 repetări bogate în leucină și 12 domenii de tip C2 asemănătoare imunoglobulinei în legătură cu perlecanul (RefSeq, 2002). Un studiu efectuat în China a identificat MXRA5 ca fiind a doua cea mai frecventă genă mutantă în cancerul pulmonar non-microcelular (Xiong et al., 2012). În cazul cancerului de colon, MXRA5 s-a dovedit a fi supraexprimat și ar putea servi drept biomarker pentru diagnosticarea precoce și metastaza omentală (Zou et al., 2002; Wang et al., 2013a).

Stimularea unui răspuns imun depinde de prezența unor antigeni recunoscuți ca străini de către sistemul imunitar al gazdei. Descoperirea antigenilor asociați tumorilor a creat posibilitatea de a folosi sistemul imunitar al gazdei pentru a interveni asupra creșterii tumorale. În prezent, imunoterapia împotriva cancerului explorează diferite mecanisme de a valorifica atât componenta umorală cât și pe cea celulară a sistemului imunitar.

Elemente specifice ale răspunsului imun celular sunt capabile de a recunoaște și distruge în mod specific celulele tumorale. Izolarea celulelor T din populațiile de celule care infiltrază tumorile sau din sângele periferic sugerează că aceste celule joacă un rol important în apărarea imunitară naturală împotriva cancerului. Celulele T CD8-pozitive, în special, care recunosc moleculele de clasă I ale peptidelor purtătoare a complexului major de histocompatibilitate (MHC) cu, de obicei, 8 până la 10 reziduuri de aminoacizi derivate din proteine sau produse ribozomale defecte (DRIP-uri) localizate în citosol, joacă un rol important în acest răspuns. Moleculele MHC umane sunt desemnate și ca antigeni leucocitari umani (HLA).

Termenul „răspuns celular T” se referă la proliferarea și activarea specifică a funcțiilor efectoare induse de o peptidă *in vitro* sau *in vivo*. Pentru celule T citotoxice restricționate la MHC de clasă I, funcțiile efectoare pot fi de liză a celulelor țintă cu peptide pulsate, precursori de peptide pulsate sau care prezintă peptide naturale, de secreție de citochine, preferabil interferon gamma, TNF-alfa sau IL-2 indusă de peptide, secreție de molecule efectoare, preferabil granzime sau perforine induse de peptidă, sau degranulare.

Termenul „peptidă” este folosit în prezentul document pentru a desemna o serie de resturi de aminoacid conectate între ele de obicei prin punți peptidice între grupările alfa-amino și carbonil ale aminoacizilor adiacenți. Peptidele au, de preferință, o lungime de 9 aminoacizi, dar pot avea o lungime de până la 8 aminoacizi și o lungime de 10, 11, 12 sau 13 aminoacizi sau mai mare, iar în cazul peptidelor MHC de clasă II (variante alungite ale peptidelor din descriere), acestea pot avea o lungime de 14, 15, 16, 17, 18, 19 sau 20 sau mai mulți aminoacizi.

În plus, termenul „peptidă” include sărurile unei serii de reziduuri de aminoacizi, conectate între ele în mod obișnuit prin legături peptidice între grupele alfa-amino și carbonil ale aminoacizilor adiacenți. De preferință, sărurile sunt săruri acceptabile din punct de vedere farmaceutic ale peptidelor, cum ar fi, de exemplu, sărurile de clorură sau de acetat (trifluoroacetat). Trebuie remarcat faptul că sărurile peptidelor conform prezentei descrieri diferă substanțial de peptidele în starea (stările) lor *in vivo*, deoarece peptidele nu sunt săruri *in vivo*.

Termenul „peptidă” include, de asemenea, „oligopeptidă”. Termenul „oligopeptidă” este folosit în prezentul document pentru a desemna o serie de resturi aminoacid conectate între ele de obicei prin punți peptidice între grupările alfa-amino și carbonil ale aminoacizilor adiacenți. Lungimea oligopeptidei nu este critică pentru descriere, atâta timp cât epitopul corect (sau epitopii corecți) se păstrează în aceasta.

Oligopeptida are de obicei o lungime mai mică de 30 de aminoacizi, dar mai mare de 15 aminoacizi.

Termenul „polipeptidă” desemnează o serie de resturi aminoacid conectate între ele de obicei prin punți peptidice între grupările alfa-amino și carbonil ale aminoacizilor adiacenți. Lungimea polipeptidei nu este critică pentru descriere atâta timp cât epitopii corecți se păstrează. Spre deosebire de termenii „peptidă” sau „oligopeptidă”, termenul „polipeptidă” se referă la molecule care conțin mai mult de circa 30 de resturi de aminoacid.

O peptidă, o oligopeptidă, o proteină sau o polinucleotidă care codifică o astfel de moleculă este „imunogenă” (și, prin urmare, este un „imunogen” în sensul prezentei descrieri), dacă este capabilă să inducă un răspuns imunitar. În cazul prezentei descrieri, imunogenitatea este definită mai specific ca fiind abilitatea de a induce un răspuns mediat de celulele T. Astfel, un „imunogen” este o moleculă capabilă să inducă un răspuns imunitar și, în cazul prezentei descrieri, o moleculă capabilă să inducă un răspuns al celulelor T. Într-un alt aspect, imunogenul poate fi peptida, complexul peptidei cu MHC, oligopeptida și/sau proteina care este utilizată pentru a crea anticorpi specifici sau TCR-uri împotriva acesteia.

Un „epitop” al celei de clasă I necesită o peptidă scurtă care se leagă de receptorul MHC de clasă I formând un complex ternar (lanț alfa MCH de clasă I, beta-2-microglobulină și peptidă) care poate fi recunoscut de o celulă T care poartă un receptor de celulă T corespunzător care se leagă de complexul MHC/peptidă cu afinitatea adecvată. Peptidele care se leagă de molecule MHC de clasă I au de obicei o lungime de 8-14 aminoacizi, cel mai frecvent având lungimea de 9 aminoacizi.

La oameni există trei loci genetici diferiți care codifică moleculele MHC de clasă I (moleculele MHC ale omului sunt și antigeni leucocitari umani desemnați (HLA)): HLA-A, HLA-B, and HLA-C. HLA-A*01, HLA-A*02 și HLA-B*07 sunt exemple de diferite alele MHC de clasă I care pot fi exprimate pe baza acestor loci.

Tabelul 2: Frecvențele F de exprimare pentru HLA-A*02 și HLA-A*24 și cele mai frecvente serotipuri HLA-DR. Frecvențele sunt deduse din frecvențele haplotipurilor Gf din populația americană adaptate din Mori et al. (Mori et al., 1997) care implică formula Hardy-Weinberg: $F=1-(1-Gf)^2$. Combinațiile de A*02 sau A*24 cu anumite alele HLA-DR pot fi îmbogățite sau mai puțin frecvente decât s-a estimat pe baza frecvențelor singulare datorită unor dezechilibre de legare. Pentru detalii, vezi Chanock et al. (Chanock et al., 2004).

Alelă	Populație	Fenotip calculat din frecvența alelei
A*02	Caucazieni (America de Nord)	49,1%
A*02	Afro-americani (America de Nord)	34,1%
A*02	Asiatic-americani (America de Nord)	43,2%
A*02	Latino-americani (America de Nord)	48,3%
DR1	Caucazieni (America de Nord)	19,4%
DR2	Caucazieni (America de Nord)	28,2%
DR3	Caucazieni (America de Nord)	20,6%
DR4	Caucazieni (America de Nord)	30,7%
DR5	Caucazieni (America de Nord)	23,3%
DR6	Caucazieni (America de Nord)	26,7%
DR7	Caucazieni (America de Nord)	24,8%
DR8	Caucazieni (America de Nord)	5,7%
DR9	Caucazieni (America de Nord)	2,1%
DR1	Africani (nord) americani	13,20%
DR2	Africani (nord) americani	29,80%
DR3	Africani (nord) americani	24,80%
DR4	Africani (nord) americani	11,10%
DR5	Africani (nord) americani	31,10%

Alelă	Populație	Fenotip calculat din frecvența alelei
DR6	Africani (nord) americani	33,70%
DR7	Africani (nord) americani	19,20%
DR8	Africani (nord) americani	12,10%
DR9	Africani (nord) americani	5,80%
DR1	Asiatici (nord) americani	6,80%
DR2	Asiatici (nord) americani	33,80%
DR3	Asiatici (nord) americani	9,20%
DR4	Asiatici (nord) americani	28,60%
DR5	Asiatici (nord) americani	30,00%
DR6	Asiatici (nord) americani	25,10%
DR7	Asiatici (nord) americani	13,40%
DR8	Asiatici (nord) americani	12,70%
DR9	Asiatici (nord) americani	18,60%
DR1	Hispanici (nord) americani	15,30%
DR2	Hispanici (nord) americani	21,20%
DR3	Hispanici (nord) americani	15,20%
DR4	Hispanici (nord) americani	36,80%
DR5	Hispanici (nord) americani	20,00%
DR6	Hispanici (nord) americani	31,10%
DR7	Hispanici (nord) americani	20,20%
DR8	Hispanici (nord) americani	18,60%
DR9	Hispanici (nord) americani	2,10%
A*24	Filipine	65%
A*24	Rusia, Neneț	61%
A*24:02	Japonia	59%
A*24	Malaysia	58%
A*24:02	Filipine	54%
A*24	India	47%
A*24	Coreea de Sud	40%
A*24	Sri Lanka	37%
A*24	China	32%
A*24:02	India	29%
A*24	Australia de Vest	22%
A*24	SUA	22%
A*24	Rusia, Samara	20%
A*24	America de Sud	20%
A*24	Europa	18%

Peptidele din prezenta descriere, de preferință atunci când sunt incluse într-un vaccin din prezenta descriere, așa cum este descris aici, se leagă de A*02. Un vaccin poate include, de asemenea, peptide MHC de clasă II care se leagă la nivel de pan-legătură. Prin urmare, vaccinul din descriere poate

fi utilizat pentru a trata cancerul la pacienți care sunt A*02-pozitivi, în timp ce nu este necesară nicio selecție pentru alotipurile MHC de clasă II datorită naturii pan-legătoare a acestor peptide.

Dacă peptidele A*02 din descriere sunt combinate cu peptide care se leagă la o altă alelă, de exemplu A*24, un procentaj mai mare din orice populație de pacienți poate fi tratat în comparație cu adresarea unei singure alele MHC clasa I. În timp ce în cele mai multe populații, mai puțin de 50% dintre pacienți ar putea fi tratați numai cu oricare dintre alele, un vaccin care cuprinde epitopi HLA-A*24 și HLA-A*02 poate trata cel puțin 60% dintre pacienții din orice populație relevantă. În mod specific, următoarele procentaje de pacienți vor fi pozitive pentru cel puțin una dintre aceste alele în diferite regiuni: SUA 61%, Europa de Vest 62%, China 75%, Coreea de Sud 77%, Japonia 86% (calculate de la www.allelefrequencies.net).

Într-o concretizare preferată, termenul „secvență nucleotidică” se referă la un heteropolimer al dezoxiribonucleotidelor.

Secvența de nucleotidă care codifică o anumită peptidă, oligopeptidă sau polipeptidă poate fi întâlnită în mod natural sau poate fi construită artificial. În general, segmentele de ADN care codifică peptidele, polipeptidele și proteinele din descriere sunt asamblate din fragmente de ADNc și legături oligonucleotidice scurte sau dintr-o serie de oligonucleotide, pentru a obține o genă sintetică care poate fi exprimată într-o unitate transcripțională recombinantă care cuprinde elemente de reglare derivate dintr-un operon microbial sau viral.

În sensul prezentului document, termenul „o nucleotidă care codifică o peptidă” se referă la o secvență de nucleotide care codifică peptida și care include codonii artificiali de start și stop compatibili cu sistemul biologic prin care secvența urmează să fie exprimată, de exemplu, o celulă dendritică sau un alt sistem celular util pentru producerea de TCR-uri.

În sensul prezentului document, referirea la o secvență de acid nucleic include atât acidul nucleic monocatenar, cât și cel bicatenar. Astfel, de exemplu pentru ADN, secvența specifică, cu excepția cazului în care contextul indică altfel, se referă la ADN-ul monocatenar al unei astfel de secvențe, la duplexul unei astfel de secvențe cu complementul său (ADN bicatenar) și la complementul unei astfel de secvențe.

Termenul „regiune de codare” se referă la acea porțiune a genei care codifică, fie în mod natural, fie în mod normal, produsul de exprimare al acelei gene în mediul său genomic natural, adică regiunea care codifică *in vivo* produsul de exprimare nativ al genei respective.

Regiunea codificatoare poate fi derivată dintr-o genă nemutantă („normală”), mutantă sau modificată, sau poate fi chiar derivată dintr-o secvență de ADN sau dintr-o genă sintetizată în întregime în laborator, folosind metode bine cunoscute de către specialiștii din domeniul sintezei de ADN.

Termenul „produs de exprimare” desemnează polipeptida sau proteina care este produsul natural de translație al genei și orice echivalent de codificare a secvenței de acid nucleic care rezultă din degenerarea codului genetic și care codifică astfel același (aceiași) aminoacid (aminoacizi).

Termenul „fragment”, când este vorba despre o secvență de codificare, se referă la o porțiune de ADN care conține mai puțin decât regiunea completă de codificare, al cărei produs complet de exprimare reține în principal aceeași funcție sau activitate biologică ca și produsul de exprimare al întregii regiuni de codificare.

Termenul „segment ADN” se referă la un polimer ADN sub forma unui fragment separat sau ca o componentă a unei structuri ADN mai mari, care a fost obținută din ADN izolat cel puțin o dată în formă substanțială pură, adică fără contaminanți endogeni și în cantități sau concentrații care permit identificarea, manevrarea și recuperarea segmentului și a secvențelor nucleotidice componente prin metode biochimice standard, de exemplu prin utilizarea unui vector de clonare. Aceste segmente sunt furnizate sub forma unui cadru deschis de citire, neîntrerupt de secvențe interne netraduse (sau introni) care sunt de obicei prezente în genele eucariote. Secvențele de ADN netradus pot fi prezente în aval de cadrul de citire deschis, unde acestea nu interferă cu manipularea sau exprimarea regiunilor de codificare.

Termenul „amorsă” se referă la o secvență de acid nucleic scurtă care se poate împerechea cu o monocatenă ADN și care asigură un capăt 3'-OH liber la nivelul căruia ADN polimeraza începe sinteza unui lanț dezoxiribonucleic.

Termenul „promotor” se referă la o regiune ADN implicată în legarea ARN-polimerazei pentru a iniția transcripția.

Termenul „izolat” se referă la faptul că materialul este îndepărtat din mediul său original (de exemplu, mediul natural, dacă apare în mod natural). De exemplu, o polinucleotidă sau polipeptidă care apare natural într-un animal viu nu este izolată; dar aceeași polinucleotidă sau polipeptidă separată de una sau toate materialele coexistente din sistemul natural reprezintă un izolat. Aceste polinucleotide pot face parte dintr-un vector și/sau aceste polinucleotide sau polipeptide pot face parte dintr-un compus, dar rămânând izolate deoarece vectorul sau compusul nu face parte din mediul natural.

Polinucleotidele și polipeptidele recombinante sau imunogene descrise în conformitate cu prezenta invenție, pot să fie în formă „purificată”. Termenul „purificat” nu se referă la puritate absolută; mai degrabă este intenționat ca definiție relativă, și poate include produse care sunt înalt purificate sau produse care sunt numai parțial purificate, deoarece acești termeni sunt înțeleși de cei instruiți în domeniul relevant. Pentru exemplificare, clonele individuale izolate dintr-o bibliotecă de ADNc au fost purificate în mod convențional până la omogenitate electroforetică. Purificarea materialelor de început sau naturale până la cel puțin un ordin de mărime, preferabil la două sau trei ordine de mărime, și ideal la patru sau cinci ordine de mărime este de dorit în special. Mai mult, se include în mod explicit o polipeptidă revendicată care are o puritate de preferință de 99,999%, sau de cel puțin 99,99% sau de 99,9%; și chiar, de dorit, de 99% masic sau mai mult.

Acizii nucleici și produsele de exprimare polipeptidică descrise în conformitate cu prezenta invenție, precum și vectorii de exprimare care conțin astfel de acizi nucleici și/sau astfel de polipeptide, pot fi în „formă îmbogățită”. În sensul prezentului document, termenul „îmbogățit” înseamnă că concentrația materialului este de cel puțin aproximativ 2, 5, 10, 100 sau 1000 de ori mai mare decât concentrația sa naturală (de exemplu), în mod avantajos de 0,01% masic, de preferință de cel puțin 0,1% masic. Produsele îmbogățite cu 0,5%, 1%, 5%, 10% și 20% masic sunt de asemenea de interes. Secvențele, compușii, vectorii, clonele și celelalte materiale care sunt cuprinse în prezenta descriere pot fi, în funcție de interes, în formă îmbogățită sau izolată. Termenul „fragment activ” înseamnă un fragment, de obicei o peptidă, o polipeptidă sau o secvență de acid nucleic, care generează un răspuns imunitar (adică are activitate imunogenă) atunci când este administrat, singur sau, opțional, cu un adjuvant adecvat sau într-un vector, unui animal, cum ar fi un mamifer, de exemplu, un iepure sau un șoarece, și, de asemenea, inclusiv un om, un astfel de răspuns imunitar luând forma stimulării unui răspuns al celulelor T în cadrul animalului receptor, cum ar fi un om. Alternativ, „fragmentul activ” poate fi, de asemenea, utilizat pentru a induce un răspuns al celulelor T *in vitro*.

Așa cum sunt utilizați în prezentul document, termenii „porțiune”, „segment” și „fragment”, atunci când sunt utilizați în legătură cu polipeptidele, se referă la o secvență continuă de reziduuri, cum ar fi reziduuri de aminoacizi, secvență care formează un subset al unei secvențe mai mari. De exemplu, dacă o polipeptidă este supusă unui tratament cu oricare dintre endopeptidazele uzuale, cum ar fi tripsina sau chimotripsina, oligopeptidele care rezultă din acest tratament reprezintă porțiuni, segmente sau fragmente ale polipeptidei inițiale. Atunci când sunt utilizați în legătură cu polinucleotidele, acești termeni se referă la produsele obținute prin tratarea polinucleotidelor respective cu oricare dintre endonucleaze.

În conformitate cu prezenta descriere, termenul „identitate procentuală” sau „procentual identic”, atunci când se referă la o secvență, înseamnă că o secvență este comparată cu o secvență revendicată sau descrisă după alinierea secvenței care urmează a fi comparată („secvența comparată”) cu secvența descrisă sau revendicată („secvența de referință”). Identitatea procentuală se determină conform următoarei formule: identitate procentuală = $100 [1 - (C/R)]$, unde C este numărul de diferențe dintre secvența de referință și secvența comparată pe lungimea aliniamentului dintre secvența de referință și cea comparată, în care

(i) fiecare bază sau aminoacid din secvența de referință care nu are un corespondent aliniat, bază sau aminoacid, în secvența comparată, și
(ii) fiecare lipsă din secvența de referință, și
(iii) fiecare bază sau aminoacid aliniat(ă) din secvența de referință care diferă de baza sau aminoacidul aliniat din secvența comparată, reprezintă o diferență și (iii) alinierea trebuie să înceapă în poziția 1 a secvențelor alinate;

și R este numărul de baze sau aminoacizi din secvența de referință pe lungimea alinierii cu secvența comparată, orice lipsă apărută în secvența de referință fiind de asemenea numărată ca bază sau aminoacid.

Dacă există o aliniere între secvența comparată și secvența de referință pentru care identitatea procentuală calculată mai sus este aproximativ egală sau mai mare decât identitatea procentuală minimă specificată, atunci secvența comparată are identitatea procentuală minimă specificată față de secvența de referință, chiar dacă pot exista alinieri în care identitatea procentuală calculată mai sus este mai mică decât identitatea procentuală specificată.

După cum s-a menționat mai sus, prezenta descriere furnizează astfel o peptidă care cuprinde o secvență care este selectată din grupul format din SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 288 sau o variantă a acestuia care este omologă în proporție de 88% cu SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 288, sau o variantă a acestuia, care va induce celule T care reacționează încrucișat cu peptida respectivă. Peptidele din descriere au capacitatea de a se lega de o moleculă a complexului major de histocompatibilitate (MHC) uman de clasă I sau de versiuni alungite ale acestor peptide la clasa II.

În prezenta descriere, termenul „omolog” se referă la gradul de identitate (a se vedea identitatea procentuală de mai sus) dintre secvențele a două secvențe de aminoacizi, adică secvențe peptidice sau polipeptidice. „Omologia” menționată mai sus se determină prin compararea a două secvențe aliniate în condiții optime față de secvențele care urmează a fi comparate. O astfel de omologie de secvență poate fi calculată prin crearea unei alinieri folosind, de exemplu, algoritmul ClustalW. Programele software de analiză a secvențelor disponibile în mod obișnuit, mai exact Vector NTI, GENETYX sau alte instrumente sunt furnizate de baze de date publice.

O persoană specializată în domeniu va putea evalua dacă celulele T induse de o variantă a unei peptide specifice vor fi capabile să reacționeze încrucișat cu peptida în sine (Appay et al., 2006; Colombetti et al., 2006; Fong et al., 2001; Zaremba et al., 1997).

Prin „variantă” a secvenței de aminoacizi date, inventatorii înțeleg că lanțurile laterale, de exemplu, ale unuia sau a două dintre reziduurile de aminoacizi sunt modificate (de exemplu, prin înlocuirea lor cu lanțul lateral al unui alt reziduu de aminoacid natural sau cu un alt lanț lateral), astfel încât peptida să fie în continuare capabilă să se lege de o moleculă HLA în mod substanțial în același mod ca o peptidă compusă din secvența de aminoacizi dată, constând în SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 288. De exemplu, o peptidă poate fi modificată astfel încât să mențină cel puțin, dacă nu să îmbunătățească, capacitatea de a interacționa cu și de a se lega la șanțul de legare al unei molecule MHC adecvate, cum ar fi HLA-A*02 sau -DR și, în acest fel, să mențină cel puțin, dacă nu să îmbunătățească, capacitatea de a se lega la TCR-ul celulelor T activate.

Aceste celule T pot ulterior să reacționeze încrucișat cu celulele și să distrugă celulele care exprimă o polipeptidă care conține secvența naturală de aminoacizi a peptidei cognate, așa cum este definită în aspectele descrierii. După cum reiese din literatura științifică și din bazele de date, anumite poziții ale peptidelor de legare HLA sunt, de obicei, reziduuri de ancorare care formează o secvență centrală care se potrivește motivului de legare al receptorului HLA, care este definit de proprietățile polare, electrofizice, hidrofobe și spațiale ale lanțurilor polipeptidice care constituie șanțul de legare. Astfel, un specialist în domeniu ar putea modifica secvențele de aminoacizi prezentate în SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO 288 prin menținerea reziduurilor de ancorare cunoscute, și ar putea determina dacă aceste variante păstrează capacitatea de a se lega de moleculele MHC de clasă I sau II. Variantele prezentei descrieri își păstrează abilitatea de a lega TCR-urile celulelor T activate, care pot reacționa încrucișat cu celulele și pot ucide celulele care exprimă polipeptida care conține secvența naturală de aminoacid a peptidei cognate definite în aspectele descrierii.

Peptidele originale (nemodificate), astfel cum sunt descrise în prezentul document, pot fi modificate prin înlocuirea uneia sau mai multor reziduuri în diferite locuri, eventual selective, din lanțul peptidic, dacă nu se specifică altfel. De preferință, aceste substituții sunt situate la capătul lanțului de aminoacizi. O astfel de substituție poate fi conservatoare, de exemplu, dacă un aminoacid este substituit cu un alt aminoacid cu structură și caracteristici similare, astfel încât de exemplu un aminoacid hidrofob să fie înlocuit cu un alt aminoacid hidrofob. Chiar mai conservativă ar fi înlocuirea aminoacizilor de aceeași mărime sau similară și de natură chimică, cum ar fi înlocuirea leucinei cu izoleucina. În studiile privind variațiile de secvență în familiile de proteine omologe care apar în mod natural, anumite substituții de aminoacizi sunt mai des tolerate decât altele, iar acestea prezintă adesea o corelație cu similitudinile de mărime, sarcină, polaritate și hidrofobicitate dintre aminoacidul original și cel de înlocuire, ceea ce constituie baza pentru definirea „substituțiilor conservative”.

Substituțiile conservatoare sunt în prezentul document definite ca schimburi în cadrul unuia dintre următoarele cinci grupuri: Grupul 1 – resturi mici, alifatic, nepolare sau ușor polare (Ala, Ser, Thr, Pro, Gly); Grupul 2 – resturi polare, încărcate negativ și amidele lor (Asp, Asn, Glu, Gln); Grupul 3 – resturi polare, încărcate pozitiv (His, Arg, Lys); Grupul 4 – resturi mari, alifatic, nepolare (Met, Leu, Ile, Val, Cys); și Grupul 5 – resturi mari, aromatice (Phe, Tyr, Trp).

Substituțiile mai puțin conservatoare pot implica schimbarea unui aminoacid cu un altul cu caracteristici similare dar oarecum diferit ca dimensiuni, cum ar fi, de exemplu, substituirea alaninei cu un rest de izoleucină. Substituțiile înalt neconservative pot implica substituirea unui aminoacid acid cu unul care este polar sau chiar bazic. Astfel de substituții „radicale” nu pot fi apreciate, totuși, ca potențial ineficiente deoarece efectele chimice nu sunt complet previzibile; astfel de substituții radicale pot provoca efecte caracterizate de serendipitate, fiind impredictibile pe baza principiilor chimice elementare.

Desigur, aceste substituții pot implica structuri diferite de L-aminoacizii uzuali. Astfel, D-aminoacizii se pot substitui cu L-aminoacizii identificați uzual în peptidele antigenice ale descrierii fiind în continuare incluși în prezentul document. În plus, aminoacizii nestandard (și anume, alții decât aminoacizii proteino-genici naturali obișnuiți) pot fi, de asemenea, utilizați în scopul substituirii pentru a produce imunogeni și polipeptide imunogene în conformitate cu prezenta descriere.

Dacă substituțiile din mai mult de o poziție se descoperă că pot conduce la o peptidă cu activitate antigenică substanțial echivalentă sau mai mare decât cea descrisă mai jos, atunci aceste substituții se vor testa pentru a identifica dacă substituțiile combinate provoacă efecte cumulative sau sinergice ale antigenicității peptidei. Cel mult, nu mai mult de patru poziții din cadrul peptidei pot fi substituite simultan.

O peptidă care constă în esență din secvența de aminoacizi indicată în prezentul document poate avea unul sau doi aminoacizi care nu sunt de ancorare (a se vedea mai jos în ceea ce privește motivul de ancorare) schimbați fără ca abilitatea de a se lega de o moleculă a complexului major de histocompatibilitate uman (MHC) de clasă I sau II să fie modificată în mod substanțial sau să fie afectată în mod negativ, în comparație cu peptida nemodificată. Într-o altă concretizare, într-o peptidă care constă în esență din secvența de aminoacizi indicată aici, unul sau doi aminoacizi pot fi schimbați cu partenerii lor de schimb conservativ (a se vedea mai jos) fără ca abilitatea de a se lega de o moleculă a complexului major de histocompatibilitate (MHC) uman de clasă I sau II să fie modificată în mod substanțial sau să fie afectată în mod negativ, în comparație cu peptida nemodificată.

Reziduurile de aminoacizi care nu contribuie în mod substanțial la interacțiunile cu receptorul de celule T pot fi modificate prin înlocuire cu alți aminoacizi a căror incorporare nu afectează în mod substanțial reactivitatea celulelor T și nu elimină legătura cu MHC-ul relevant. Astfel, în afară de condiția menționată, peptida din prezenta descriere poate fi orice peptidă (termen prin care inventatorii includ oligopeptida sau polipeptida), care include secvențele de aminoacizi sau o porțiune sau variantă a acestora, așa cum sunt prezentate.

Pot fi, de asemenea, adecvate peptide mai lungi (elongate). Este posibil ca epitopii MHC de clasă I, deși au de obicei o lungime cuprinsă între 8 și 11 aminoacizi, să fie generați prin procesarea peptidelor din peptide sau proteine mai lungi care includ epitopul real. Este preferabil ca resturile care flanchează epitopul efectiv să fie resturi care să nu influențeze substanțial clivajul proteolitic necesar pentru expunerea epitopului efectiv în timpul procesării.

Peptidele din descriere pot fi alungite cu până la patru aminoacizi, adică 1, 2, 3 sau 4 aminoacizi pot fi adăugați la ambele capete în orice combinație între 4:0 și 0:4. Combinațiile de elongații descrise în prezentul document pot fi găsite în Tabelul 3.

Tabelul 3: Combinații de elongații ale peptidelor din descriere

C-terminal	N-terminal
4	0
3	0 sau 1
2	0 sau 1 sau 2
1	0 sau 1 sau 2 sau 3
0	0 sau 1 sau 2 sau 3 sau 4
N-terminal	C-terminal
4	0
3	0 sau 1
2	0 sau 1 sau 2
1	0 sau 1 sau 2 sau 3
0	0 sau 1 sau 2 sau 3 sau 4

Aminoacizii pentru alungire/extindere pot fi peptidele din secvența originală a proteinei sau orice alt aminoacid (alți aminoacizi). Alungirea poate fi utilizată pentru a spori stabilitatea sau solubilitatea peptidelor.

Astfel, epitopi ai prezentei descrieri pot fi identici cu epitopi naturali asociați tumorilor sau specifici tumorilor sau pot include epitopi care nu diferă cu mai mult de patru reziduuri de peptida de referință, atât timp cât au o activitate antigenică substanțial identică.

Într-o altă concretizare, peptida este alungită pe una sau pe ambele părți cu mai mult de 4 aminoacizi, de preferință până la o lungime totală de până la 30 de aminoacizi. Acest lucru poate duce la peptide de legare la MHC-ul de clasă II. Legarea la MHC-ul de clasă II poate fi testată prin metode cunoscute în domeniu.

În consecință, prezenta descriere furnizează peptide și variante ale epitopilor MHC de clasă I, în care peptida sau varianta are o lungime totală cuprinsă între 8 și 100 de aminoacizi, preferabil între 8 și 30 de aminoacizi, și cel mai preferabil între 8 și 14 aminoacizi, și anume 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 aminoacizi; în cazul peptidelor alungite de legare de clasă II, lungimea poate fi și de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 sau 22 de aminoacizi.

Bineînțeles, peptida sau varianta conform prezentei descrieri va avea capacitatea de a se lega de o moleculă din complexul major de histocompatibilitate (MHC) uman clasă I sau II. Legarea unei peptide sau a unei variante la un complex MHC poate fi testată prin metode cunoscute în domeniu.

De preferință, atunci când celulele T specifice pentru o peptidă conform prezentei descrieri sunt testate împotriva peptidelor substituie, concentrația de peptidă la care peptidele substituie obțin jumătate din creșterea maximă a lizei în raport cu fondul nu este mai mare de aproximativ 1 mM, preferabil nu mai mare de aproximativ 1 μ M, mai preferabil nu mai mare de aproximativ 1 nM, și încă și mai preferabil nu mai mare de aproximativ 100 pM și cel mai preferabil nu mai mare de aproximativ 10 pM. Este, de asemenea, de preferat ca peptida substituită să fie recunoscută de celule T provenind de la mai mulți indivizi, cel puțin doi și, preferabil, trei indivizi.

Într-o concretizare deosebit de preferată a descrierii, peptida constă sau constă în esență dintr-o secvență de aminoacizi conform SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 288.

„Care constă în esență din” înseamnă că o peptidă conform prezentei descrieri, în plus față de secvența conformă cu oricare dintre secvențele SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 288 sau o variantă a acesteia, conține segmente suplimentare de aminoacizi localizați N- și/sau C-terminal care nu fac neapărat parte din peptida care funcționează ca epitop pentru epitopul moleculelor MHC.

Totuși, aceste resturi pot fi importante pentru a furniza o introducere adecvată a peptidei care face obiectul prezentei descrieri în interiorul celulelor. Într-o concretizare a prezentei descrieri, peptida face parte dintr-o proteină de fuziune care cuprinde, de exemplu, cei 80 de aminoacizi N-terminali ai lanțului invariant asociat cu antigenul HLA-DR (p33, în continuare „Ii”), așa cum rezultă din NCBI, numărul de acces GenBank X00497. În alte fuziuni, peptida din prezenta descriere poate fi fuzionată cu un anticorp, astfel cum este descris în prezenta descriere, sau cu o parte funcțională a acestuia, în special într-o secvență a unui anticorp, astfel încât să fie ținută în mod specific de respectivul anticorp sau, de exemplu, cu sau într-un anticorp care este specific pentru celulele dendritice, astfel cum este descris în prezentul document.

În plus, peptida sau varianta pot fi ulterior modificate pentru a îmbunătăți stabilitatea și/sau legarea de molecule MHC pentru a exercita un răspuns imun mai puternic. Metodele pentru această optimizare a secvenței de peptidă este cunoscută în domeniu și poate include, de exemplu, introducerea unor legături peptidice inversate sau a unor legături non-peptidice.

Într-o legătură peptidică inversă, reziduurile de aminoacizi nu sunt unite prin legături peptidice (-CO-NH-), ci legătura peptidică este inversată. Astfel de peptidomimetice retro-inversate pot fi realizate folosindu-se metode cunoscute în domeniu, de exemplu, cum ar fi cele descrise în Meziere et al (1997) (Meziere et al., 1997). Această abordare implică sinteza de pseudopeptide care conțin modificări care implică scheletul și nu orientarea lanțurilor secundare. Meziere et al. (Meziere et al., 1997) demonstrează că aceste pseudopeptide sunt utile pentru legarea MHC și răspunsurile celulelor T helper. Peptidele retro-inversate, care conțin legături NH-CO și nu legături peptidice CO-NH, sunt mult mai rezistente la proteoliză.

O legătură non-peptidică este, de exemplu, -CH₂-NH-, -CH₂S-, -CH₂CH₂-, -CH=CH-, -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- sau -CH₂SO-. US 4,897,445 furnizează o metodă pentru sinteza în fază solidă a unor legături non-peptidice (-CH₂-NH) în lanțuri de polipeptide care implică polipeptide sintetizate de procedurile standard și legături non-peptidice sintetizate prin reacția dintre o amino-aldehidă și un aminoacid în prezența NaCNBH₃.

Peptidele care conțin secvențele descrise mai sus pot fi sintetizate cu ajutorul unor grupări chimice suplimentare prezente la capetele amino- sau carboxi-terminale, pentru a îmbunătăți stabilitatea, biodisponibilitatea și/sau afinitatea peptidelor. De exemplu, grupările hidrofobe, cum ar fi carbo-benzoxil, dansil sau T-butil-oxi-carbonil pot fi adăugate capătului peptidic amino-terminal. Similar, o grupare acetil sau o grupare 9-fluorenil-metoxi-carbonil se poate plasa la capătul amino-terminal al peptidei. În plus, grupările hidrofobe, cum ar T-butil-oxi-carbonil, sau o grupare amido- pot fi adăugate capătului peptidic amino-terminal.

Mai mult, peptidele din descriere pot fi sintetizate pentru a li se modifica configurația sterică. De exemplu, se poate folosi izomerul D al unuia sau mai multor resturi de aminoacid peptidic în locul izomerului L uzual. Ba chiar mai mult, cel puțin unul dintre resturile de aminoacid al peptidei din descriere poate fi substituit cu unul dintre resturile de aminoacid cunoscute, care nu apar în mod natural. Astfel de modificări pot servi la creșterea stabilității, biodisponibilității și/sau a acțiunii de legare ale peptidelor din descriere.

Similar, o peptidă sau o variantă din descriere se poate modifica din punct de vedere chimic prin reacții cu diverși aminoacizi înainte sau după sinteza peptidei. Exemple de astfel de modificări sunt bine cunoscute în domeniu și sunt rezumate, de exemplu, în R. Lundblad, Chemical Reagents for Protein Modification, 3rd ed. CRC Press, 2004 (Lundblad, 2004). Modificarea chimică a aminoacizilor include,

fără a se limita la, modificarea prin acilare, amidinare, piridoxilarea lizinei, alkilare reductivă, trinitrobenzilarea grupurilor amino cu acid 2,4,6-trinitrobenzen sulfonic (TNBS), modificarea amidică a grupărilor carboxil și sulfhidril prin oxidarea cu acid performic a cisteinei la acid cisteic, formarea de derivați de mercur, formarea de disulfuri mixte cu alți compuși tiolici, reacția cu maleimidă, carboximetilarea cu acid iodoacetic sau iodoacetamidă și carbamoilare cu cianat la pH alcalin, deși fără a se limita la acestea. În aceste privințe, doritorii sunt trimiși la Capitolul 15 al protocolului prezent din Protein Science, Eds. Coligan et al. (John Wiley and Sons NY 1995-2000) (Coligan et al., 1995) pentru o metodologie mai amplă referitoare la modificarea chimică a proteinelor.

Pe scurt, modificarea de exemplu a resturilor arginil sunt de obicei bazate pe reacția dintre compușii dicarbonil vecini cum ar fi fenilgloxal, 2, 3-butandionă, și 1,2-ciclohexan-dionă pentru formarea unui aduct. Un alt exemplu e reacția dintre metilgloxal și resturile de arginină. Cisteina se poate modifica fără modificarea concomitentă a altor situri nucleofile cum ar fi lizina și histidina. Ca rezultat, pentru modificarea cisteinei sunt disponibili un număr mare de reactivi. Site-urile web ale unor companii, cum ar fi Sigma-Aldrich (<http://www.sigma-aldrich.com>) furnizează informații despre anumiți reactivi.

Reducerea selectivă a punților disulfurice din proteine este și ea frecventă. Punțile disulfurice se pot forma și oxida prin tratamentul termic al produselor biofarmaceutice. Reactivul K de la Woodward se poate folosi pentru modificarea resturilor de acid glutamic. N-(3-(dimetil-amino)propil)-N'-etilcarbodiimida se poate folosi pentru a forma legături intra-moleculare între un rest de lizină și un rest de acid glutamic. De exemplu, dietilpirocarbonatul este un reactiv pentru modificarea resturilor de histidil din proteine. Histidina se poate modifica la rândul sau folosind 4-hidroxi-2-nonenal. Reacția resturilor de lizină și a altor grupări α -amino este utilă, de exemplu, pentru legarea peptidelor de suprafețe sau de legături încrucișate proteine/peptide. Lisina este locul de atașare a poli(etilen)glicolului și locul principal de modificare în cazul glicolizării proteinelor. Resturile de metionină din proteine se pot modifica, de exemplu, folosind iodoacetamidă, brometilamină și cloramina T.

Tetranitrometanul și N-acetil-imidazolul se pot folosi pentru modificarea resturilor tirozil. Legarea încrucișată prin formarea de ditirozină poate fi realizată cu ioni de cupru sau apă oxigenată.

Studii recente privind modificarea triptofanului au utilizat N-bromosuccinimidă, bromură 2-hidroxi-5-nitrobenzil sau 3-bromo-3-metil-2-(2-nitrofenilmercapto)-3H-indol (BPNS-scatol).

Modificarea cu succes a proteinelor și peptidelor terapeutice cu PEG este adesea asociată cu o extindere a timpului de înjumătățire circulatorie în timpul legării încrucișate a proteinelor cu glutaraldehidă, diacrilat de polietilen-glicol, iar formaldehida este utilizată pentru pregătirea hidrogelurilor. Modificarea chimică a alergenilor pentru imunoterapie este obținută adesea prin carbamilarie cu cianat de potasiu.

O peptidă sau o variantă, în care peptida este modificată sau include legături non-peptidice, este o concretizare preferată a descrierii. În general, peptidele și variantele (cel puțin cele care conțin legături peptidice între reziduurile de aminoacizi) pot fi sintetizate prin sinteza peptidelor în fază solidă în modul Fmoc-poliamidă, așa cum este prezentat de Lukas et al. (Lukas et al., 1981) și de referințele citate. Protecția temporară a grupării N-amino este asigurată de gruparea 9-fluorenilmetiloxycarbonil (Fmoc). Clivajul repetitiv al acestei grupări de protecție cu intensă lăbilitate de bază este realizat folosind 20% piperdină în N,N-dimetilformamidă. Funcționalitățile lanțurilor secundare se pot proteja sub forma butil-eterilor (în cazul serinei, treoninei și tirozinei), a butil-esterilor (în cazul acizilor glutamic și aspartic), a derivaților butiloxycarbonil (în cazul lizinei și histidinei), a derivaților tritol (în cazul cisteinei) și a derivaților de 4-metoxi-2,3,6-trimetilbenzensulfonil (în cazul argininei). Dacă resturile C-terminale sunt glutamina sau asparagina, pentru protejarea funcției amido a lanțului secundar se va folosi gruparea 4,4'-dimetoxibenzhidril. Suportul în fază solidă se bazează pe un polimer de polidimetilacrilamidă constituit din trei monomeri: dimetilacrilamidă (monomer de bază), bisacriloloiletilendiamină (agent de legătură încrucișată) și ester metilic de acrililsarcosină (agent de funcționalizare). Agentul de legătură peptid-rășină scindabil folosit este derivatul labil în mediu acid al acidului 4-hidroximetil-fenoxiacetic. Toți derivații aminoacid sunt adăugați sub formă de derivați simetrici anhidri preformați cu excepția asparaginei și glutaminei, care sunt adăugate folosind o procedură de cuplare inversă mediată de N,N-diciclohexil-carbodiimidă/1-hidroxibenzotriazol. Toate reacțiile de cuplare și deprotecare sunt monitorizate folosind proceduri care folosesc ninhidrină, trinitrobenzen, acid sulfonic și izotin-test. După finalizarea sintezei, peptidele sunt scindate din suportul rezinic cu îndepărtarea concomitentă a grupărilor protectoare ale lanțurilor secundare prin tratarea cu acid trifluoroacetic 95% care conține un amestec curățător 50%. Printre agenții de curățare utilizați în mod obișnuit se numără etan-ditiolul, fenolul, anizolul și apa, alegerea exactă depinzând de aminoacizii constituenți ai peptidei care se sintetizează. De asemenea, este posibilă o combinație de metodologii în fază solidă și în fază de soluție pentru sinteza peptidelor (a se vedea, de exemplu, (Bruckdorfer et al., 2004) și referințele citate).

Acidul trifluoracetic este eliminat prin evaporare în vid, cu triturare ulterioară cu eter dietilic, obținându-se peptida brută. Eventualii agenți de curățare prezenți sunt eliminați printr-o procedură simplă de extragere care, prin liofilizarea fazei apoase, permite obținerea peptidei brute fără agenți de curățare. Reactivii pentru sinteza peptidelor sunt în general disponibili, de exemplu, la Calbiochem-Novabiochem (Nottingham, Regatul Unit).

Purificarea poate fi efectuată prin oricare dintre tehnicile sau printr-o combinație de tehnici, cum ar fi recristalizarea, cromatografia de excludere a dimensiunii, cromatografia de schimb de ioni, cromatografia de interacțiune hidrofobă și (de obicei) cromatografia lichidă de înaltă performanță în fază inversă folosind, de exemplu, separarea în gradient acetonitril/apă.

Analiza peptidelor poate fi efectuată folosind cromatografie în strat subțire, electroforeză, în particular electroforeză capilară, extragere în fază solidă (CSPE), cromatografie lichidă de înaltă performanță în fază inversă, analiză a aminoacizilor după hidroliza acidă și prin analiză spectrometrică în masă la bombardarea rapidă cu atomi (FAB), dar și analiză spectrometrică în masă de tip MALDI și ESI-Q-TOF.

Pentru identificarea peptidelor din prezenta descriere, baza de date a datelor de exprimare a ARN-ului disponibile în mod public (Lonsdale, 2013) din aproximativ 3.000 de eșantioane de țesut normal a fost verificată pentru genele cu exprimare aproape absentă în sistemele de organe vitale și cu exprimare scăzută în alte sisteme de organe importante. Într-o a doua etapă, peptidele asociate cancerului, derivate din produsele proteice ale acestor gene, au fost identificate prin spectrometrie de masă cu ajutorul platformei XPRESIDENT™, așa cum este descris în prezentul document.

În detaliu, pentru a selecta genele de interes utilizând datele RNASeq din baza de date menționată, sistemele de organe vitale au fost considerate a fi: creierul, inima, vasele de sânge, plămânii și ficatul. Mediana de citiri pe kilobază per milion de citiri (RPKM) pentru organele vitale trebuia să fie mai mică de 2, iar percentila de 75% trebuia să fie mai mică de 5 RPKM pentru selectarea genei. În cazul în care sistemele de organe au fost acoperite de mai mult de o clasă de eșantioane, de exemplu, diferite regiuni ale creierului care au fost analizate separat, pentru calcul s-a utilizat mediana maximă și percentila maximă de 75% din clasele de eșantioane multiple. Alte sisteme de organe importante au fost considerate a fi: pielea, nervii, hipofiza, colonul, rinichii, țesutul adipos, glanda suprarenală, vezica urinară, sângele integral, esofagul, mușchii, pancreasul, glanda salivară, intestinul subțire, stomacul, glanda mamară, splina, glanda tiroidă. Pentru selectarea genei, a fost necesar ca RPKM-ul median maxim pentru aceste organe să fie mai mic de 10. Celelalte organe au fost considerate ca fiind nevitală și, prin urmare, nu s-a aplicat nicio valoare de prag pentru exprimarea genelor. Aceste organe erau colul uterin și uterul, trompele uterine, vaginul, prostata, testiculele și ovarul. Folosind acest filtru, au fost selectate aproximativ 14.000 de gene candidate. Apoi, au fost analizate profilurile de prezentare a peptidelor derivate din proteinele corespunzătoare. Peptidele au fost considerate interesante dacă au fost prezentate în mai puțin de cinci eșantioane normale dintr-un set de peste 170 de eșantioane normale (adică necanceroase) analizate și dacă cea mai mare prezentare a țesutului normal a fost mai mică de 30% din semnalul median al tumorii (pe toate eșantioanele tumorale).

Pentru a selecta peptidele supraprezentate, se calculează un profil de prezentare care arată prezentarea mediană a eșantioanelor, precum și variația replicilor. Profilul juxtapune eșantioane ale entității tumorale de interes la o bază de referință de eșantioane de țesut normal. Fiecare dintre aceste profiluri poate fi apoi consolidat într-un scor de supraprezentare prin calcularea valorii p a unui model liniar cu efecte mixte (Pinheiro et al., 2015) care se ajustează pentru teste multiple prin rata de descoperiri false (Benjamini și Hochberg, 1995).

Pentru identificarea și cuantificarea relativă ale liganzilor HLA prin spectrometrie de masă, au fost purificate moleculele HLA din probele de țesut congelate rapid și au fost izolate peptidele asociate cu HLA. Peptidele izolate au fost separate și secvențele au fost identificate prin experimente de cromatografie lichidă-spectrometrie de masă (LC-MS) cu nano-electropulverizare-ionizare (nanoESI) online. Secvențele peptidice rezultate au fost verificate prin compararea modelului de fragmentare a TUMAP-urilor naturale înregistrate din eșantioane tumorale primare cu modelele de fragmentare ale peptidelor sintetice de referință corespunzătoare cu secvențe identice. Având în vedere că peptidele au fost identificate direct ca liganzi ai moleculelor HLA din tumorile primare, aceste rezultate reprezintă o dovadă directă a procesării și prezentării naturale a peptidelor identificate pe țesutul canceros primar.

Numerele de eșantioane au fost (în total/eșantioane care au trecut QC): pentru PC N=39 (36), pentru CCR N= 22 (18), pentru CCR N=31 (28), pentru carcinom esofagian N= 14 (11), pentru BPH și cancer de prostată N= 53 (43), pentru HCC N=15 (15), pentru NSCLC N=96 (87), pentru GC N=35 (33), pentru GB N= 38 (27), pentru cancer de glandă mamară N= 2 (2), pentru melanom N=5 (2), pentru cancer ovarian N= 21 (20), pentru LLC N= 5 (4), pentru SCLC N= 18 (17), NHL N= 18 (18), AML N= 23 (18), GBC, CCC N= 18 (17), pentru UBC N= 17 (15), pentru UEC N= 19 (16). Probele au trecut de controlul

de calitate (QC) dacă sunt achiziționate 5 replici de spectrometrie de masă sau dacă proba este consumată complet, iar peptidele utilizate pentru a calcula factorul de normalizare (adică care apar în replici tehnice ale aceleiași probe cu o variație mai mică de 50% și care apar în cel puțin 2 eșantioane independente) reprezintă cel puțin 30% din toate peptidele măsurate în eșantion. Eșantioanele care au fost subțipate, rezultând un subtip rar (cum ar fi A*02:05, A*02:06) au fost excluse pentru selectarea peptidelor din prezenta descriere.

Pipeline-ul descoperirii XPRESIDENT® v2.1 (a se vedea, de exemplu, US 2013-0096016) permite identificarea și selectarea candidaților de vaccinuri peptidice supraprezentate relevante pe baza cuantificării relative directe a nivelurilor de peptide restricționate de HLA pe țesuturile canceroase în comparație cu mai multe țesuturi și organe necanceroase diferite. Acest lucru a fost realizat prin dezvoltarea unei cuantificări diferențiale fără marcaje, utilizând datele LC-MS achiziționate și procesate de un pipeline propriu de analiză a datelor, care combină algoritmi de identificare a secvențelor, de grupare spectrală, de numărare a ionilor, de aliniere a timpului de retenție, de deconvoluție și normalizare a stării de încărcare.

Au fost stabilite niveluri de prezentare, inclusiv estimări de eroare pentru fiecare peptidă și eșantion. Au fost identificate peptide prezentate exclusiv pe țesutul tumoral și peptide supraprezentate în țesuturile și organele tumorale față de cele necanceroase.

Complexele HLA-peptidă din eșantioane primare de HCC, CRC, GB, GC, cancer esofagian, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, melanom, cancer de glandă mamară, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC și CLL au fost purificate, iar peptidele asociate cu HLA au fost izolate și analizate prin LC-MS (vezi exemplele). Toate TUMAP-urile conținute în prezenta solicitare de brevet au fost identificate cu această abordare pe probe de HCC, CRC, GB, GC, cancer esofagian, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, melanom, cancer de glandă mamară, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC și/sau CLL, confirmând prezentarea lor pe aceste tipuri de tumori.

TUMAP-urile identificate pe mai multe tumori și țesuturi normale au fost cuantificate prin numărarea ionică a datelor LC-MS fără marcarea. Metoda presupune că zonele de semnal LC-MS ale unei peptide sunt corelate cu abundența acesteia în eșantion. Toate semnalele cantitative ale unei peptide din diferite experimente LC-MS au fost normalizate pe baza tendinței centrale, au fost calculate ca medie per eșantion și au fost reunite într-un grafic cu bare, numit profil de prezentare. Profilul de prezentare consolidează diferite metode de analiză, cum ar fi căutarea în bazele de date de proteine, gruparea spectrală, deconvoluția stării de încărcare (descărcare) și alinierea și normalizarea timpului de retenție.

În plus, pipeline-ul descoperirii XPRESIDENT® v2.x permite cuantificarea directă absolută a nivelurilor de peptide restricționate de MHC, de preferință HLA, pe țesuturi canceroase sau alte țesuturi infectate. Pe scurt, numărul total de celule a fost calculat din conținutul total de ADN al eșantionului de țesut analizat. Cantitatea totală de peptide pentru un TUMAP într-un eșantion de țesut a fost măsurată prin nanoLC-MS/MS ca raport între TUMAP-ul natural și o cantitate cunoscută a unei versiuni marcate cu izotopi a TUMAP-ului, așa-numitul standard intern. Eficacitatea izolării TUMAP-urilor a fost determinată prin adăugarea complexelor peptidă:MHC ale tuturor TUMAP-urilor selectate în lizatul tisular în cel mai scurt moment posibil al procedurii de izolare a TUMAP-urilor și detectarea lor prin nanoLC-MS/MS după finalizarea procedurii de izolare a peptidelor. Numărul total de celule și cantitatea de peptidă totală au fost calculate pe baza măsurătorilor triplicate pentru fiecare eșantion de țesut. Eficacitatea de izolare specifică peptidelor a fost calculată ca medie din 10 experimente cu adăugare, fiecare fiind măsurat ca triplicat (vezi Exemplul 6 și Tabelul 11).

Această analiză combinată a exprimării ARN și a datelor de spectrometrie de masă a dus la obținerea celor 288 de peptide din prezenta descriere. În multe cazuri, peptida a fost identificată doar pe un număr mic de tumori. Cu toate acestea, din cauza sensibilității limitate a analizei de rutină prin spectrometrie de masă, datele ARN oferă o bază mult mai bună pentru estimarea acoperirii (vezi Exemplul 2).

Prezenta descriere furnizează peptide care sunt utile în tratarea cancerelor/tumorilor, de preferință HCC, CRC, GB, GC, cancer esofagian, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, melanom, cancer de glandă mamară, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC și CLL care prezintă în exces sau în exclusivitate peptidele din prezenta dezvoltare. S-a demonstrat prin spectrometrie de masă că aceste peptide sunt prezentate în mod natural de moleculele HLA în probele primare umane de HCC, CRC, GB, GC, cancer esofagian, NSCLC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, melanom, cancer de glandă mamară, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC, CLL și/sau în probele de PC.

Multe dintre genele-/proteinele-sursă (denumite și „proteine de lungime completă” sau „proteine de bază”) din care sunt derivate peptidele s-au dovedit a fi puternic supraexprimate în cancer în comparație cu țesuturile normale – „țesuturile normale”, în legătură cu această descriere înseamnă fie țesuturi sănătoase de tipul tumorii corespunzătoare (ficat, colon/rect, creier, stomac, esofag, plămân,

pancreas, rinichi, prostată, ovar, piele, glandă mamară și leucocite), fie alte celule din țesuturi normale, demonstrând un grad ridicat de asociere tumorală a genelor-sursă (vezi Exemplul 2). Mai mult, peptidele în sine sunt puternic supraprezentate pe țesutul tumoral – „țesut tumoral”, în sensul prezentei descrieri, însemnând un eșantion de la un pacient care suferă de HCC, CRC, GB, GC, cancer esofagian, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, melanom, cancer de glandă mamară, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC sau CLL, dar nu și pe țesuturile normale (vezi Exemplul 1).

Peptidele legate de HLA pot fi recunoscute de sistemul imunitar, în special de limfocitele T. Celulele T pot distruge celulele care prezintă complexul HLA/peptidă recunoscut, de exemplu HCC, CRC, GB, GC, cancer esofagian, NSCLC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, melanom, cancer de glandă mamară, PC, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC sau celule CLL care prezintă peptidele derivate.

S-a demonstrat că peptidele din prezenta descriere sunt capabile să stimuleze răspunsurile celulelor T și/sau sunt suprareprezentate și, prin urmare, pot fi utilizate pentru producerea de anticorpi și/sau TCR-uri, cum ar fi TCR-uri solubile, în conformitate cu prezenta descriere (a se vedea Exemplul 3 și Exemplul 4). Mai mult, peptidele, atunci când sunt complexate cu MHC-ul respectiv, pot fi utilizate, de asemenea, pentru producerea de anticorpi și/sau TCR-uri, în special sTCR-uri, în conformitate cu prezenta descriere. Metodele respective sunt bine cunoscute de către specialiștii în domeniu și pot fi găsite, de asemenea, în literatura de specialitate. Astfel, peptidele din prezenta descriere sunt utile pentru a genera un răspuns imunitar la un pacient, prin care celulele tumorale pot fi distruse. Răspunsul imunitar la pacient se poate induce prin administrarea directă a peptidelor descrise sau a substanțelor precursor adecvate (de exemplu peptide elongate, proteine sau acizi nucleici care codifică aceste peptide) pacientului, în mod ideal combinate cu un agent care crește imunogenitatea. Răspunsul imunitar care are originea în astfel de vaccinare terapeutică se poate aștepta să fie foarte specific împotriva celulelor tumorale deoarece peptidele țintă ale prezentei descrieri nu sunt prezente pe țesuturi normale în numere de copii comparabile, fapt care previne riscul unor reacții autoimune nedorite îndreptat împotriva celulelor normale ale pacientului.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la receptorii de celule T (TCR-uri) care cuprind un lanț alfa și un lanț beta („TCR alfa/beta”). De asemenea, sunt furnizate peptidele capabile să se lege la TCR-uri și anticorpi atunci când sunt prezentate de o moleculă MHC. Prezenta descriere se referă, de asemenea, la acizi nucleici, vectori și celule-gazdă pentru exprimarea TCR-urilor și a peptidelor din prezenta descriere, precum și la metode de utilizare a acestora.

Termenul „receptor de celule T” (prescurtat TCR) se referă la o moleculă heterodimerică care cuprinde un lanț polipeptidic alfa (lanț alfa) și un lanț polipeptidic beta (lanț beta), în care receptorul heterodimeric este capabil să se lege de un antigen peptidic prezentat de o moleculă HLA. Termenul include, de asemenea, așa-numitele TCR-uri gamma/delta.

Într-una dintre concretizări, descrierea furnizează o metodă de producere a unui TCR, așa cum este descrisă aici, metoda cuprinzând cultivarea unei celule-gazdă capabile să exprime TCR-ul în condiții adecvate pentru a promova exprimarea TCR-ului.

Într-un alt aspect, descrierea se referă la metodele conform descrierii, în care antigenul este încărcat pe moleculele MHC de clasă I sau II exprimate pe suprafața unei celule prezentatoare de antigen adecvate sau a unei celule prezentatoare de antigen artificiale prin punerea în contact a unei cantități suficiente de antigen cu o celulă prezentatoare de antigen sau antigenul este încărcat pe tetrameri MHC de clasă I sau II prin tetramerizarea monomerilor complexului antigen/ MHC de clasă I sau II.

Lanțurile alfa și beta ale TCR-urilor alfa/beta și lanțurile gamma și delta ale TCR-urilor gamma/delta sunt în general considerate ca având fiecare două „domenii”, și anume domeniul variabil și domeniul constant. Domeniul variabil constă într-o concatenare a regiunii variabile (V) și a regiunii de îmbinare (J). Domeniul variabil poate include, de asemenea, o regiune lider (L). Lanțurile beta și delta pot include, de asemenea, o regiune de diversitate (D). Domeniile constante alfa și beta pot include, de asemenea, domenii transmembranare (TM) C-terminale care ancorează lanțurile alfa și beta la membrana celulară.

În ceea ce privește TCR-urile gamma/delta, termenul „domeniu variabil TCR gamma”, astfel cum este utilizat în prezentul document, se referă la concatenarea regiunii TCR gamma V (TRGV) fără regiunea lider (L) și a regiunii TCR gamma J (TRGJ), iar termenul domeniu constant TCR gamma se referă la regiunea TRGC extracelulară sau la o secvență TRGC trunchiată C-terminală. De asemenea, termenul „domeniu variabil TCR delta” se referă la concatenarea regiunii TCR delta V (TRDV) fără regiunea lider (L) și a regiunii TCR delta D/J (TRDD/TRDJ), iar termenul „domeniu constant TCR delta” se referă la regiunea TRDC extracelulară sau la o secvență TRDC trunchiată C-terminală.

TCR-urile din prezenta descriere se leagă, de preferință, la un complex peptidă-moleculă HLA cu o afinitate de legare (KD) de aproximativ 100 μ M sau mai puțin, aproximativ 50 μ M sau mai puțin,

aproximativ 25 μ M sau mai puțin, sau aproximativ 10 μ M sau mai puțin. Mai preferate sunt TCR-urile de mare afinitate care au afinități de legare de aproximativ 1 μ M sau mai puțin, de aproximativ 100 nM sau mai puțin, de aproximativ 50 nM sau mai puțin, de aproximativ 25 nM sau mai puțin. Exemple nelimitative de intervale preferate de afinitate de legare pentru TCR-urile din prezenta descriere includ de la aproximativ 1 nM la aproximativ 10 nM; de la aproximativ 10 nM la aproximativ 20 nM; de la aproximativ 20 nM la aproximativ 30 nM; de la aproximativ 30 nM la aproximativ 40 nM; de la aproximativ 40 nM la aproximativ 50 nM; de la aproximativ 50 nM la aproximativ 60 nM; de la aproximativ 60 nM la aproximativ 70 nM; de la aproximativ 70 nM la aproximativ 80 nM; de la aproximativ 80 nM la aproximativ 90 nM; și de la aproximativ 90 nM la aproximativ 100 nM.

În sensul prezentei descrieri cu privire la TCR-uri, termenul „legare specifică” și variantele gramaticale ale acestuia sunt utilizate pentru a desemna un TCR care are o afinitate de legare (KD) pentru un complex peptidă-moleculă HLA de 100 μ M sau mai puțin.

TCR-urile heterodimerice alfa/beta din prezenta descriere pot avea o legătură disulfurică introdusă între domeniile lor constante. TCR-urile preferate de acest tip le includ pe cele care au o secvență de domeniu constant TRAC și o secvență de domeniu constant TRBC1 sau TRBC2, cu excepția faptului că Thr 48 din TRAC și Ser 57 din TRBC1 sau TRBC2 sunt înlocuite cu reziduuri de cisteină, cisteinele respective formând o legătură disulfurică între secvența de domeniu constant TRAC și secvența de domeniu constant TRBC1 sau TRBC2 a TCR-ului.

Cu sau fără legătura introdusă între lanțuri menționată mai sus, TCR-urile heterodimerice alfa/beta din prezenta descriere pot avea o secvență de domeniu constant TRAC și o secvență de domeniu constant TRBC1 sau TRBC2, iar secvența de domeniu constant TRAC și secvența de domeniu constant TRBC1 sau TRBC2 ale TCR-ului pot fi legate prin legătura disulfurică nativă dintre Cys4 din exonul 2 al TRAC și Cys2 din exonul 2 al TRBC1 sau TRBC2.

TCR-urile din prezenta descriere pot cuprinde un marker detectabil selectat din grupul format dintr-un radionuclid, un fluorofor și biotină. TCR-urile din prezenta descriere pot fi conjugate cu un agent activ din punct de vedere terapeutic, cum ar fi un radionuclid, un agent chimioterapeutic sau o toxină.

Într-una dintre concretizări, un TCR din prezenta descriere care are cel puțin o mutație în lanțul alfa și/sau care are cel puțin o mutație în lanțul beta are glicozilarea modificată în comparație cu TCR-ul nemutant.

Într-una dintre concretizări, un TCR care conține cel puțin o mutație în lanțul alfa al TCR-ului și/sau în lanțul beta al TCR are o afinitate de legare și/sau un timp de înjumătățire de legare pentru un complex peptidă-moleculă HLA, care este cel puțin dublu față de un TCR care conține lanțul alfa al TCR-ului nemutant și/sau lanțul beta al TCR-ului nemutant. Amplificarea afinității TCR-urilor specifice tumorilor și exploatarea acestora se bazează pe existența unei ferestre pentru afinitățile TCR optime. Existența unei astfel de ferestre se bazează pe observațiile conform cărora TCR-urile specifice pentru agenții patogeni restricționați de HLA-A2 au valori KD care sunt, în general, de aproximativ 10 ori mai mici în comparație cu TCR-urile specifice pentru autoantigenii asociați tumorilor HLA-A2-restricționate. În prezent se cunoaște că, deși antigenii tumorali au potențialul de a fi imunogeni, deoarece tumorile provin din propriile celule ale individului, doar proteinele mutante sau cele cu procesare translațională modificată vor fi considerate străine de către sistemul imunitar. Antigenii care sunt reglați în sens crescător sau supraexprimați (așa-numiții autoantigeni) nu vor induce neapărat un răspuns imunitar funcțional împotriva tumorii: Celulele T care exprimă TCR-uri foarte reactive la acești antigeni vor fi fost selectate negativ în timus într-un proces cunoscut sub numele de toleranță centrală, ceea ce înseamnă că rămân doar celulele T cu TCR-uri cu afinitate scăzută pentru autoantigeni. Prin urmare, afinitatea TCR-urilor sau a variantelor din prezenta descriere față de peptidele conform descrierii poate fi îmbunătățită prin metode bine cunoscute în domeniu.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la o metodă de identificare și izolare a unui TCR în conformitate cu prezenta descriere, metoda respectivă cuprinzând incubarea de PBMC-uri de la donatori sănătoși HLA-A*02-negativi cu monomeri A2/peptidă, incubarea PBMC-urilor cu tetramer-ficoeritrină (PE) și izolarea celulelor T cu aviditate mare prin analiză cu sortare celulară activată prin fluorescență (FACS)-Calibur.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la o metodă de identificare și izolare a unui TCR în conformitate cu prezenta descriere, metoda respectivă cuprinzând obținerea unui șoarece transgenic cu toți locii genici TCR $\alpha\beta$ umani (1.1 și 0.1. 7 Mb), ale cărui celule T exprimă un repertoriu TCR uman divers care compensează deficiența TCR de șoarece, imunizarea șoarecelui cu peptida de interes, incubarea PBMC obținute de la șoarecii transgenici cu tetramer-ficoeritrină (PE) și izolarea celulelor T cu aviditate mare prin analiză cu sortare celulară activată prin fluorescență (FACS)-Calibur.

Într-unul dintre aspecte, pentru a obține celule T care exprimă TCR-urile din prezenta descriere, acizii nucleici care codifică lanțurile TCR-alfa și/sau TCR-beta din prezenta descriere sunt clonați în

vectori de exprimare, cum ar fi retrovirusul gamma sau lentivirusul. Virusurile recombinante sunt generate și apoi testate pentru funcționalitate, cum ar fi specificitatea antigenului și aviditatea funcțională. O parte aliquotă din produsul final este apoi utilizată pentru a transduce populația de celule T-țintă (în general purificată din PBMC-uri ale pacientului), care este expandată înainte de a fi perfuzată pacientului.

Într-un alt aspect, pentru a obține celule T care exprimă TCR-urile din prezenta descriere, ARN-urile TCR sunt sintetizate prin tehnici cunoscute în domeniu, de exemplu, prin sisteme de transcripție *in vitro*. ARN-urile TCR sintetizate *in vitro* sunt apoi introduse în celulele T CD8+ primare obținute de la donatori sănătoși prin electroporare pentru a reexprima lanțurile TCR-alfa și/sau TCR-beta specifice tumorii.

Pentru a crește exprimarea, acizii nucleici care codifică TCR-urile din prezenta descriere pot fi legați în mod operațional de promotori puternici, cum ar fi repetările terminale lungi (LTR) retrovirale, citomegalovirusul (CMV), virusul celulelor stem murine (MSCV) U3, fosfoglicerat kinaza (PGK), β -actina, ubiquitina și un promotor compozit al virusului simian 40 (SV40)/CD43, factorul de elongare (EF)-1a și promotorul virusului de formare a focarelor splenice (SFFV). Într-o concretizare preferată, promotorul este heterolog cu acidul nucleic care este exprimat.

În plus față de promotorii puternici, casetele de exprimare TCR din prezenta descriere pot conține elemente suplimentare care pot amplifica exprimarea transgenică, inclusiv un tract polipurinic central (cPPT) (Follenzi et al., 2000), care promovează translocarea nucleară a construcțiilor lentivirale, și elementul de reglare posttranscripțională a virusului hepatitei Woodchuck (wPRE), care crește nivelul de exprimare a transgenică prin creșterea stabilității ARN-ului (Zufferey et al., 1999).

Lanțurile alfa și beta ale unui TCR din prezenta descriere pot fi codificate de acizi nucleici localizați în vectori separați sau pot fi codificate de polinucleotide localizate în același vector.

Obținerea unui nivel ridicat de exprimare la suprafața TCR-ului necesită ca ambele lanțuri TCR-alfa și TCR-beta ale TCR-ului introdus să fie transcripționate la niveluri ridicate. Pentru a face acest lucru, lanțurile TCR-alfa și TCR-beta din prezenta descriere pot fi clonate în construcții bi-cistronice într-un singur vector, care s-a dovedit a fi capabil să depășească acest obstacol. Utilizarea unui situs de intrare intraribozomal viral (IRES) între lanțurile TCR-alfa și TCR-beta are ca rezultat exprimarea coordonată a ambelor lanțuri, deoarece lanțurile TCR-alfa și TCR-beta sunt generate dintr-o singură transcripție care este scindată în două proteine în timpul translației, asigurând producerea unui raport molar egal între lanțurile TCR-alfa și TCR-beta. (Schmitt et al.) 2009).

Acizii nucleici care codifică TCR-uri din prezenta descriere pot fi optimizați din punct de vedere al codonului pentru a crește exprimarea dintr-o celulă-gazdă. Redundanța în codul genetic permite ca unii aminoacizi să fie codificați prin mai mult de un codon, dar anumiți codoni sunt mai puțin „optimi” decât alții din cauza disponibilității relative a ARNt-urilor corespunzătoare, precum și a altor factori (Gustafsson et al., 2004). S-a demonstrat că modificarea secvențelor genelor TCR-alfa și TCR-beta astfel încât fiecare aminoacid să fie codificat de codonul optim pentru exprimarea genei de mamifer, precum și eliminarea motivelor de instabilitate a ARNm-ului sau a situsurilor de scindare criptice, sporește semnificativ exprimarea genelor TCR-alfa și TCR-beta (Scholten et al., 2006).

Mai mult decât atât, o diferență între lanțurile TCR introduse și cele endogene poate duce la dobândirea unor specificități care prezintă un risc semnificativ pentru autoimunitate. De exemplu, formarea de dimeri TCR combinați poate reduce numărul de molecule CD3 disponibile pentru a forma complexe TCR împerecheate corespunzător și, prin urmare, poate scădea semnificativ aviditatea funcțională a celulelor care exprimă TCR-ul introdus (Kuball et al., 2007).

Pentru a reduce împerecherea greșită, domeniul C-terminal al lanțurilor TCR introduse din prezenta descriere poate fi modificat pentru a promova afinitatea între lanțuri, reducând în același timp capacitatea lanțurilor introduse de a se împerechea cu TCR-ul endogen. Aceste strategii pot include înlocuirea domeniilor C-terminal TCR-alfa și TCR-beta umane cu omologii lor murini (domeniu C-terminal murinizat); generarea unei a doua legături disulfurice între lanțuri în domeniul C-terminal prin introducerea unui al doilea reziduu de cisteină în ambele lanțuri TCR-alfa și TCR-beta ale TCR-ului introdus (modificarea cu cisteină); schimbarea reziduurilor de interacțiune din domeniile C-terminale ale lanțurilor TCR-alfa și TCR-beta („knob-in-hole”); și fuzionarea domeniilor variabile ale lanțurilor TCR-alfa și TCR-beta direct cu CD3 ζ (fuziune CD3 ζ). (Schmitt et al.) 2009).

Într-una dintre concretizări, o celulă-gazdă este modificată pentru a exprima un TCR din prezenta descriere. În concretizările preferate, celula-gazdă este o celulă T umană sau un progenitor de celulă T umană. În unele concretizări, celula T sau progenitorul de celule T este obținut de la un pacient cu cancer. În alte concretizări, celula T sau progenitorul de celule T este obținut de la un donator sănătos. Celulele-gazdă din prezenta descriere pot fi alogene sau autologe în ceea ce privește un pacient care urmează să fie tratat. Într-una dintre concretizări, gazda este o celulă T gamma/delta transformată pentru a exprima un TCR alfa/beta.

O „compoziție farmaceutică” este o compoziție adecvată pentru a fi administrată unei ființe umane într-o instituție medicală. De preferință, o compoziție farmaceutică este sterilă și produsă în conformitate cu orientările GMP.

Compozițiile farmaceutice cuprind peptidele fie sub formă liberă, fie sub forma unei săruri acceptabile din punct de vedere farmaceutic (a se vedea și mai sus). În sensul prezentului document, „o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic” se referă la un derivat al peptidelor prezentate, în care peptida este modificată prin obținerea de săruri acide sau bazice ale agentului. De exemplu, sărurile acide se prepară din baza liberă (de obicei, în cazul în care forma neutră a medicamentului are o grupare neutră -NH₂), implicând reacția cu un acid adecvat. Acizii adecvați pentru prepararea sărurilor acide includ atât acizi organici, de exemplu acid acetic, acid propionic, acid glicolic, acid piruvic, acid oxalic, acid malic, acid malonic, acid succinic, acid maleic, acid fumaric, acid tartric, acid citric, acid benzoic, acid cinamic, acid mandelic, acid metan-sulfonic, acid etan-sulfonic, acid p-toluensulfonic, acid salicilic și altele asemenea, precum și acizi anorganici, de exemplu acid clorhidric, acid bromhidric, acid sulfuric, acid azotic, acid fosforic și altele asemenea. Dimpotrivă, preparatele sărurilor bazice ale grupărilor acide care pot face parte din peptidă sunt preparate folosind o bază acceptabilă farmaceutic, cum ar fi hidroxidul de sodiu, hidroxidul de potasiu, hidroxidul de amoniu, hidroxidul de calciu, trimetilamina sau altele asemenea.

Într-o concretizare deosebit de preferată, compozițiile farmaceutice cuprind peptidele sub formă de săruri ale acidului acetic (acetați), ale trifluoroacetaților sau ale acidului clorhidric (cloruri).

De preferință, medicamentul din prezenta descriere este un imunoterapeutic, cum ar fi un vaccin. Acesta poate fi administrat direct pacientului, în organul afectat sau pe cale sistemică i.d., i.m., s.c., i.p. și i.v., sau poate fi aplicat *ex vivo* celulelor provenite de la pacient sau unei linii de celule umane care sunt ulterior administrate pacientului, sau poate fi utilizat *in vitro* pentru a selecta o subpopulație de celule imune provenite de la pacient, care sunt apoi readministrate pacientului. În cazul în care acidul nucleic este administrat celulelor *in vitro*, poate fi util ca celulele să fie transfectate astfel încât să coexprime citokine imunostimulatoare, cum ar fi interleukina-2. Peptida poate fi substanțial pură sau poate fi combinată cu un adjuvant imunostimulator (a se vedea mai jos) sau poate fi utilizată în combinație cu citokine imunostimulatoare, sau poate fi administrată cu un sistem de livrare adecvat, de exemplu lipozomi. De asemenea, peptida poate fi conjugată cu un transportor adecvat, cum ar fi hemocianina melcului *Megathura crenulata* (keyhole limpet hemocyanin, KLH) sau mannan (vezi WO 95/18145 și (Longenecker et al., 1993)). Peptida poate fi, de asemenea, marcată, poate fi o proteină de fuziune sau poate fi o moleculă hibridă. Se așteaptă ca peptidele a căror secvență este prezentată în prezenta descriere să stimuleze celulele T CD4 sau CD8. Cu toate acestea, stimularea celulelor T CD8 este mai eficientă în prezența ajutorului furnizat de celulele CD4 T-helper. Astfel, pentru epitopi MHC de clasă I care stimulează celulele T CD8, partenerul de fuziune sau secțiunile unei molecule hibride furnizează în mod corespunzător epitopi care stimulează celulele T CD4-pozitive. Epitopi care stimulează CD4 și CD8 sunt bine cunoscuți în domeniu și îi includ pe cei identificați în prezenta descriere.

Într-un aspect, vaccinul cuprinde cel puțin o peptidă având secvența de aminoacizi prezentată de la SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 288 și cel puțin o peptidă suplimentară, de preferință între 2 și 50 de peptide, mai preferabil între 2 și 25 de peptide, chiar mai preferabil între 2 și 20 de peptide și cel mai preferabil între 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 sau 18 peptide. Peptida (peptidele) poate (pot) fi derivată (derivate) din una sau mai multe TAA-uri specifice și se poate (pot) lega de molecule MHC de clasă I.

Un alt aspect al descrierii furnizează un acid nucleic (de exemplu o polinucleotidă) care codifică o peptidă sau o variantă a peptidei din descriere. Polinucleotida poate fi, de exemplu, ADN, ADNc, ANP, ARN sau combinații ale acestora, fie monocatenar și/sau bicatenar, fie forme native sau stabilizate de polinucleotide, cum ar fi, de exemplu, polinucleotide cu o cu bază de fosforotioat și poate sau nu să conțină introni, atât timp cât codifică peptida. Desigur, numai peptidele care conțin reziduuri de aminoacizi naturali unite prin legături peptidice naturale pot fi codificate de un polinucleotid. Un alt aspect al descrierii oferă un vector de exprimare capabil să exprime o polipeptidă în conformitate cu descrierea.

Au fost dezvoltate o varietate de metode pentru a lega polinucleotide, în special ADN, de vectori, de exemplu prin terminus coeziv complementar. De exemplu segmentului ADN i se pot adăuga regiuni homopolimerice complementare care să fie introduse în ADN-ul vector. Vectorul și segmentul de ADN sunt apoi unite prin legături de hidrogen între cozile homopolimerice complementare pentru a forma molecule de ADN recombinante.

Agenții de legare sintetici care conțin unul sau mai multe situsuri de restricție furnizează o metodă alternativă de îmbinare a segmentului de ADN cu vectorii. Agenții de legare sintetici care conțin

o varietate de situsuri de endonuclează de restricție sunt disponibili în comerț de la o serie de surse, inclusiv International Biotechnologies Inc. New Haven, CN, SUA.

O metodă dezirabilă de modificare a ADN-ului care codifică polipeptida din descriere utilizează reacția în lanț a polimerazei, așa cum este prezentată de Saiki RK, et al. (Saiki et al., 1988). Această metodă poate fi utilizată pentru a introduce ADN-ul într-un vector adecvat, de exemplu prin inginerie în situsuri de restricție adecvate, sau poate fi utilizată pentru a modifica ADN-ul în alte moduri utile, așa cum este cunoscut în domeniu. În cazul în care se utilizează vectori virali, se preferă vectorii pox- sau adenovirus.

ADN-ul (sau în cazul vectorilor retrovirali, ARN-ul) poate fi apoi exprimat într-o gazdă adecvată pentru a produce o polipeptidă compusă din peptidă sau varianta din descriere. Astfel, ADN-ul care codifică peptida sau varianta din descriere poate fi utilizat în conformitate cu tehnicile cunoscute, modificat corespunzător instrucțiunilor din prezentul document, pentru a construi un vector de exprimare, care este apoi utilizat pentru a transforma o celulă-gazdă adecvată pentru exprimarea și producerea polipeptidei din descriere. Astfel de tehnici le includ pe cele prezentate, de exemplu în US 4,440,859, 4,530,901, 4,582,800, 4,677,063, 4,678,751, 4,704,362, 4,710,463, 4,757,006, 4,766,075 și 4,810,648.

ADN-ul (sau, în cazul vectorilor retrovirali, ARN-ul) care codifică polipeptida care constituie compusul din descriere poate fi unit cu o mare varietate de alte secvențe de ADN pentru a fi introdus într-o gazdă adecvată. ADN-ul însoțitor va depinde de natura gazdei, de modul de introducere a ADN-ului în gazdă și de dorința de menținere sau de integrare episomală.

În general, ADN-ul este inserat într-un vector de exprimare, cum ar fi o plasmidă, în orientarea corespunzătoare și în cadrul de citire corect pentru exprimare. Dacă este necesar, ADN-ul poate fi legat de secvențe de nucleotide de control al reglării transcripționale și translaționale adecvate recunoscute de gazda dorită, deși astfel de controale sunt în general disponibile în vectorul de exprimare. Vectorul este apoi introdus în gazdă prin tehnici standard. În general, nu toate gazdele vor fi transformate de vector. Prin urmare, va fi nevoie de selectarea unor celule-gazdă transformate. Una dintre tehnicile de selecție implică incorporarea în vectorul de exprimare a unei secvențe de ADN, cu toate elementele de control necesare, care codifică pentru o trăsătură selectabilă în celula transformată, cum ar fi rezistența la antibiotice.

Alternativ, gena pentru o astfel de trăsătură selectabilă se poate afla pe un alt vector, care este utilizat pentru a co-transforma celula-gazdă dorită.

Celulele-gazdă care au fost transformate de ADN-ul recombinant din descriere sunt apoi cultivate pentru o perioadă suficientă de timp și în condiții adecvate, cunoscute de specialiștii în domeniu, având în vedere instrucțiunile din prezentul document, pentru a permite exprimarea polipeptidei, care poate fi apoi recuperată.

Sunt cunoscute multe sisteme de exprimare, inclusiv bacterii (de exemplu, *E. coli* și *Bacillus subtilis*), levuri (de exemplu, *Saccharomyces cerevisiae*), fungi filamentosi (de exemplu, *Aspergillus spec.*), celule vegetale, celule animale și celule de insecte. Este de preferat ca sistemul să poată fi format din celule de mamifere, cum ar fi celulele CHO, disponibile din ATCC Cell Biology Collection.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la o celulă-gazdă transformată cu o construcție de vector polinucleotidică din prezenta descriere. Celula-gazdă poate fi procariotă sau eucariotă. Celulele bacteriene pot fi, în anumite circumstanțe, celule-gazdă procariote preferate și, de obicei, sunt o tulpină de *E. coli*, cum ar fi, de exemplu, tulpinile de *E. coli* DH5 disponibile de la Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, SUA, și RR1 disponibile de la American Type Culture Collection (ATCC) din Rockville, MD, SUA (nr. ATCC 31343). Celulele gazdă eucariote preferate includ celule de levuri, de insecte și de mamifere, de preferință celule de vertebrate, cum ar fi cele de șoarece, de șobolan sau de maimuță ori linii de celule fibroblastice și de colon umane. Celulele-gazdă de levuri includ YPH499, YPH500 și YPH501, care sunt în general disponibile de la Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, SUA. Celulele-gazdă preferate de mamifere includ celulele ovariene de hamster chinezesc (CHO) disponibile la ATCC sub denumirea CCL61, celulele embrionare de șoarece elvețian NIH/3T3 disponibile la ATCC sub denumirea CRL 1658, celulele COS-1 derivate din rinichi de maimuță disponibile la ATCC sub denumirea CRL 1650 și celulele 293, care sunt celule de rinichi embrionar uman. Celulele de insecte preferate sunt celulele Sf9, care pot fi transfectate cu vectori de exprimare baculovirus. O prezentare generală cu privire la alegerea celulelor-gazdă adecvate pentru exprimare poate fi găsită, de exemplu, în manualul de Paulina Balbás și Argelia Lorence „Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols”, Part One, Second Edition, ISBN 978-1-58829-262-9, precum și în alte lucrări cunoscute de către specialiști.

Transformarea gazdelor celulare corespunzătoare cu o construcție de ADN din prezenta descriere se realizează prin metode bine cunoscute, care depind de obicei de tipul de vector utilizat. În ceea ce privește transformarea celulelor-gazdă procariote, a se vedea, de exemplu, Cohen et al. (Cohen et al.,

1972) și (Green and Sambrook, 2012). Transformarea celulelor de levuri este descrisă în Sherman et al. (Sherman et al., 1986). Metoda lui Beggs (Beggs, 1978) este, de asemenea, utilă. În ceea ce privește celulele vertebrale, reactivii utili pentru transfectarea acestor celule, de exemplu fosfatul de calciu și DEAE-dextranul sau formulările lipozomice, sunt disponibile la Stratagene Cloning Systems sau Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD 20877, SUA. Electroporarea este, de asemenea, utilă pentru transformarea și/sau transfectarea celulelor și este bine cunoscută în artă pentru transformarea celulelor de levuri, a celulelor bacteriene, a celulelor de insecte și a celulelor de vertebrale.

Celulele transformate cu succes, adică celulele care conțin o construcție de ADN din prezenta descriere, pot fi identificate prin tehnici bine cunoscute, cum ar fi PCR. Alternativ, prezența proteinei în stratul supranatant poate fi detectată folosind anticorpi.

Se va aprecia că anumite celule gazdă ale descrierii sunt utile la prepararea peptidelor din descriere, de exemplu celulele bacteriene, de levuri și de insecte. Cu toate acestea, și alte celule-gazdă pot fi utile în anumite metode terapeutice. De exemplu, celulele prezentatoare de antigen, cum ar fi celulele dendritice, pot fi utilizate în mod util pentru a exprima peptidele din descriere, astfel încât acestea să poată fi încărcate în moleculele MHC corespunzătoare. Astfel, prezenta descriere furnizează o celulă-gazdă care cuprinde un acid nucleic sau un vector de exprimare în conformitate cu invenția.

Într-o concretizare preferată, celula gazdă este o celulă prezentatoare de antigen, în special o celulă dendritică sau o celulă prezentatoare de antigen. APC-urile încărcate cu o proteină de fuziune recombinantă care conține fosfatază acidă prostatică (PAP) au fost aprobate de către Administrația americană pentru alimente și medicamente (FDA), la 29 aprilie 2010, pentru tratarea HRPC-urilor metastatice asimptomatice sau minim simptomatice (Sipuleucel-T) (Rini et al., 2006; Small et al., 2006).

Un alt aspect al descrierii oferă o metodă de producere a peptidei sau a variantei sale, metoda cuprinzând cultivarea unei celule-gazdă și izolarea peptidei din celula-gazdă sau din mediul de cultură al acesteia.

Într-o altă concretizare, peptida, acidul nucleic sau vectorul de exprimare al descrierii sunt utilizate în medicină. De exemplu, peptida sau varianta sa poate fi preparată pentru injectare intravenoasă (i.v.), injectare subcutanată (s.c.), injectare intradermică (i.d.), injectare intraperitoneală (i.p.) sau injectare intramusculară (i.m.). Metodele preferate de injectare a peptidelor includ s.c., i.d., i.p., i.m. și i.v. Metodele preferate de injectare a ADN-ului includ i.d., i.m., s.c., i.p. și i.v. Se pot administra doze de exemplu între 50 μg și 1,5 mg, de preferință între 125 μg și 500 μg, de peptidă sau ADN, care depind de peptida sau de ADN-ul respectiv. Dozele din acest interval au fost utilizate cu succes în studiile anterioare (Walter et al., 2012).

Polinucleotida utilizată pentru vaccinarea activă poate fi substanțial pură sau poate fi conținută într-un vector sau sistem de livrare adecvat. Acidul nucleic poate fi ADN, ADNc, APN, ARN sau o combinație a acestora. Metodele de concepere și de introducere a unui astfel de acid nucleic sunt bine cunoscute în domeniu. O prezentare generală este furnizată, de exemplu, de Teufel et al. (Teufel et al., 2005). Vaccinurile polinucleotidice sunt ușor de preparat, însă modul de acțiune al acestor vectori în inducerea unui răspuns imun nu este pe deplin înțeles. Vectorii și sistemele de livrare adecvate includ ADN-ul și/sau ARN-ul viral, cum ar fi sistemele bazate pe adenovirus, virusul vaccinia, retrovirusuri, virusul herpetic, adenovirusul asociat sau hibridi care conțin elemente din mai multe virusuri. Sistemele de eliberare non-virale includ lipide cationice și polimeri cationici și sunt bine cunoscute în domeniul eliberării de ADN. Se poate utiliza, de asemenea, livrarea fizică, cum ar fi prin intermediul unui „pistol de gene”. Peptida sau peptidele codificate de acidul nucleic pot fi o proteină de fuziune, de exemplu, cu un epitop care stimulează celulele T pentru CDR-ul opus respectiv, așa cum s-a menționat mai sus.

Adjuvanții preferați sunt anti-CD40, imiquimod, resiquimod, GM-CSF, ciclofosfamidă, sunitinib, bevacizumab, interferon-alfa, oligonucleotide CpG și derivați, poli-(I:C) și derivați, ARN, sildenafil și formulări particulare cu PLG sau virozomi.

Într-o concretizare preferată, în compoziția farmaceutică conform descrierii, adjuvantul este selectat din grupul format din factori de stimulare a coloniilor, cum ar fi factorul de stimulare a coloniilor de macrofage granulocite (GM-CSF, sargramostim), ciclofosfamidă, imiquimod, resiquimod și interferon-alfa.

Într-o concretizare preferată, în compoziția farmaceutică conform descrierii, adjuvantul este selectat din grupul format din factori de stimulare a coloniilor, cum ar fi factorul de stimulare a coloniilor de macrofage granulocite (GM-CSF, sargramostim), ciclofosfamidă și interferon-alfa. Într-o concretizare preferată a compoziției farmaceutice conform descrierii, adjuvantul este ciclofosfamidă, imiquimodul sau resiquimodul. Adjuvanți și mai preferați sunt Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, poli-ICLC (Hiltonol®) și mAb anti-CD40 sau combinații ale acestora.

Această compoziție este utilizată pentru administrare parenterală, cum ar fi administrarea subcutanată, intradermică, intramusculară sau orală. În acest scop, peptidele și, opțional, alte molecule

sunt dizolvate sau suspendate într-un suport acceptabil din punct de vedere farmaceutic, de preferință apos. În plus, compoziția poate conține excipienți, cum ar fi tampoane, agenți de legare, agenți de declanșare, diluanți, arome, lubrifianți etc. Peptidele pot fi, de asemenea, administrate împreună cu substanțe imunostimulatoare, cum ar fi citokinele. Lista exhaustivă de excipienți care se pot folosi în această compoziție poate, de exemplu, fi preluată din A. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients (Kibbe, 2000). Compoziția poate fi utilizată pentru prevenirea, profilaxia și/sau terapia bolilor adenomatoase sau canceroase. Exemple de formulări pot fi găsite, de exemplu, în EP2112253.

Este important să se înțeleagă că răspunsul imunitar declanșat de vaccinul conform descrierii atacă cancerul în diferite stadii celulare și în diferite stadii de dezvoltare. În plus, sunt atacate diferite căi de semnalizare asociate cancerului. Acesta este un avantaj față de vaccinurile care se adresează doar uneia sau câtorva ținte, ceea ce poate determina tumoarea să se adapteze cu ușurință la atac (evadare a tumorii). În plus, nu toate tumorile individuale exprimă același model de antigeni. Prin urmare, o combinație de mai multe peptide asociate tumorilor asigură faptul că fiecare tumoră poartă cel puțin o parte din ținte. Compoziția este concepută în așa fel încât fiecare tumoră să exprime mai mulți antigeni și să acopere mai multe căi independente necesare pentru creșterea și menținerea tumorii. Astfel, vaccinul poate fi utilizat „gata de utilizare” pentru o populație mai mare de pacienți. Acest lucru înseamnă că o preselecție a pacienților care urmează să fie tratați cu vaccinul poate fi limitată la tipizarea HLA, nu necesită evaluări suplimentare ale biomarkerilor pentru expresia antigenului, dar se asigură totuși că mai multe ținte sunt atacate simultan de răspunsul imunitar indus, ceea ce este important pentru eficacitate (Banchereau et al., 2001; Walter et al., 2012).

Peptidele din prezenta invenție pot fi utilizate pentru a genera și dezvolta anticorpi specifici împotriva complexelor MHC-peptidă. Aceștia pot fi utilizați pentru terapie, direcționând toxine sau substanțe radioactive către țesutul bolnav. O altă utilizare a acestor anticorpi poate fi direcționarea radionuclizilor către țesutul bolnav în scopuri imagistice, cum ar fi PET. Această utilizare poate ajuta la detectarea metastazelor mici sau la determinarea dimensiunii și localizării precise a țesuturilor bolnave.

Prin urmare, un alt aspect al descrierii este acela de a furniza o metodă de producere a unui anticorp recombinant care se leagă în mod specific de un complex major de histocompatibilitate (MHC) uman de clasă I sau II, fiind complexat cu un antigen restricționat HLA, metoda cuprinzând: imunizarea unui mamifer non-uman modificat genetic care cuprinde celule care exprimă complexul major de histocompatibilitate (MHC) uman de clasă I sau II cu o formă solubilă a unei molecule MHC de clasă I sau II care este complexată cu antigenul restricționat de HLA; izolarea moleculelor de ARNm din celulele producătoare de anticorpi ale mamiferului non-uman; producerea unei biblioteci de afișare de fagi care prezintă molecule de proteine codificate de moleculele de ARNm respective; și izolarea a cel puțin unui fag din biblioteca de afișare de fagi, cel puțin un fag prezentând anticorpul care se leagă în mod specific de complexul major de histocompatibilitate (MHC) uman de clasă I sau II care este complexat cu antigenul restricționat de HLA.

Un alt aspect al descrierii este acela de a furniza un anticorp care se leagă în mod specific de un complex major de histocompatibilitate (MHC) uman de clasă I sau II, fiind complexat cu un antigen restricționat de HLA, în care anticorpul este, de preferință, un anticorp policlonal, un anticorp monoclonal, un anticorp bi-specific și/sau un anticorp himeric.

Metodele respective de producere a unor astfel de anticorpi și a complexelor majore de histocompatibilitate de clasă I cu lanț unic, precum și alte instrumente pentru producerea acestor anticorpi sunt prezentate în WO 03/068201, WO 2004/084798, WO 01/72768, WO 03/070752 și în publicații (Cohen et al., 2003a; Cohen et al., 2003b; Denkberg et al., 2003).

De preferință, anticorpul se leagă cu o afinitate de legare la complex mai mică de 20 nanomoli, de preferință mai mică de 10 nanomoli, ceea ce este, de asemenea, considerat ca fiind „specific” în contextul prezentei descrieri.

Prezenta descriere se referă la o peptidă care cuprinde o secvență care este selectată din grupul format din SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 288 sau o variantă a acesteia care este cel puțin 88% omologă (de preferință identică) cu SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 288 sau o variantă a acesteia care induce celule T care reacționează încrucișat cu respectiva peptidă, în care respectiva peptidă nu este polipeptida de lungime completă care stă la baza acesteia.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la o peptidă care cuprinde o secvență care este selectată din grupul format din SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 288 sau o variantă a acesteia care este cel puțin 88% omologă (de preferință identică) cu SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 288, în care respectiva peptidă sau variantă are o lungime totală cuprinsă între 8 și 100 de aminoacizi, preferabil între 8 și 30 de aminoacizi și, cel mai preferabil, între 8 și 14 aminoacizi.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la peptidele descrise în prezentul document care au capacitatea de a se lega de o moleculă a complexului major de histocompatibilitate (MHC) uman de clasă I sau II.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la peptidele descrise în prezentul document, în care peptida constă sau constă în principal dintr-o secvență de aminoacizi conform SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 288.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la peptidele descrise în prezentul document, în care peptid este modificată și/sau include legături non-peptidice.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la peptidele descrise în prezentul document, în care peptida face parte dintr-o proteină de fuziune, cuprinzând în special aminoacizii N-terminali ai lanțului invariant asociat antigenului HLA-DR (Ii), sau în care peptida este fuzionată cu (sau în) un anticorp, cum ar fi, de exemplu, un anticorp care este specific pentru celulele dendritice.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la un acid nucleic care codifică peptidele descrise în prezentul document, cu condiția ca peptida să nu fie o proteină umană completă (integrală).

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la acidul nucleic conform descrierii, care este ADN, ADNc, ANP, ARN sau combinații ale acestora.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la un vector de exprimare capabil să exprime un acid nucleic așa cum este descris în prezentul document.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la o peptidă, așa cum este descrisă în prezentul document, la un acid nucleic, așa cum este descris în prezentul document, sau la un vector de exprimare, așa cum este descris în prezentul document, pentru utilizare în medicină, în special în tratamentul pentru HCC, CRC, GB, GC, cancer esofagian, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, melanom, cancer de glandă mamară, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC sau CLL.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la o celulă-gazdă care cuprinde un acid nucleic așa cum este descris în prezentul document sau un vector de exprimare așa cum este descris în prezentul document,

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la celula-gazdă, așa cum este descrisă în prezentul document, care este o celulă prezentatoare de antigen și, de preferință, o celulă dendritică.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la o metodă de producere a unei peptide, așa cum este descrisă în prezentul document, metoda respectivă cuprinzând cultivarea celulei-gazdă, așa cum este descris în prezentul document, și izolarea peptidei din celula-gazdă sau din mediul de cultură al acesteia.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la metoda, așa cum este descrisă în prezentul document, în care antigenul este încărcat pe moleculele MHC de clasă I sau II exprimate pe suprafața unei celule prezentatoare de antigen adecvate prin punerea în contact a unei cantități suficiente de antigen cu o celulă prezentatoare de antigen.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la metoda, așa cum este descrisă în prezentul document, în care celula prezentatoare de antigen cuprinde un vector de exprimare capabil să exprime respectiva peptidă care conține SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 288 sau respectiva variantă a secvenței de aminoacizi.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la celulele T activate, produse prin metoda descrisă în prezentul document, în care aceste celule T recunosc în mod selectiv o celulă care exprimă în mod aberant o polipeptidă care cuprinde o secvență de aminoacizi, așa cum este descrisă în prezentul document.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la o metodă de distrugere a celulelor-țintă la un pacient, celule-țintă care exprimă în mod aberant o polipeptidă care cuprinde orice secvență de aminoacizi, așa cum este descrisă în prezentul document, metoda cuprinzând administrarea la pacient a unui număr eficient de celule T, așa cum este descris în prezentul document.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la utilizarea oricărei peptide descrise, a unui acid nucleic, așa cum este descris în prezentul document, a unui vector de exprimare, așa cum este descris în prezentul document, a unei celule, așa cum este descrisă în prezentul document, sau a unei limfocite T citotoxice activate, așa cum este descrisă în prezentul document, ca medicament sau la fabricarea unui medicament. Prezenta descriere se referă, de asemenea, la o utilizare conform descrierii, în care medicamentul este activ împotriva cancerului.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la o utilizare conform descrierii, în care medicamentul este un vaccin. Prezenta descriere se referă, de asemenea, la o utilizare conform descrierii, în care medicamentul este activ împotriva cancerului.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la o utilizare așa cum este prezentată în prezentul document, în care celulele canceroase sunt HCC, CRC, GB, GC, cancer esofagian, NSCLC, PC, RCC,

BPH/PCA, OC, MCC, melanom, cancer de glandă mamară, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC sau celule CLL.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la anumite proteine-marker și biomarkeri pe baza peptidelor prezentate aici, denumite în continuare „ținte”, care pot fi utilizate în diagnosticul și/sau prognosticul pentru HCC, CRC, GB, GC, cancer esofagian, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, MCC, melanom, cancer de glandă mamară, SCLC, NHL, AML, GBC, GBC, CCC, UBC, UEC sau CLL. Prezenta descriere se referă, de asemenea, la utilizarea acestor ținte noi pentru tratamentul cancerului.

Termenul „anticorp” sau „anticorpi” este utilizat în prezentul document în sens larg și include atât anticorpii policlonali, cât și monoclonali. Pe lângă moleculele de imunoglobulină intacte sau „complete”, în termenul de „anticorpi” sunt incluse și fragmente (de exemplu, CDR, fragmente Fv, Fab și Fc) sau polimeri ai acestor molecule de imunoglobulină și versiuni umanizate ale moleculelor de imunoglobulină, atâta timp cât prezintă oricare dintre proprietățile dorite (de exemplu, legarea specifică de un HCC, CRC, GB, GC, cancer esofagian, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, melanom, cancer de glandă mamară, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC, sau (poli)peptidă-marker de CLL, administrarea unei toxine la un HCC, CRC, GB, GC, cancer esofagian, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, melanom, cancer de glandă mamară, SCLC, NHL, AML, GBC, GBC, CCC, UBC, UEC sau celule CLL care exprimă o genă marker-de cancer la un nivel crescut și/sau inhibarea activității unei polipeptide-marker de HCC, CRC, GB, GC, cancer esofagian, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, melanom, cancer de glandă mamară, SCLC, NHL, AML, GBC, GBC, CCC, UBC, UEC sau CLL), așa cum este descris în prezentul document.

Ori de câte ori este posibil, anticorpii din descriere pot fi achiziționați din surse comerciale. Anticorpii din descriere pot fi, de asemenea, generați prin metode bine cunoscute. Specialistul în domeniu va înțelege că fie polipeptidele-marker de HCC, CRC, GB, GC, cancer esofagian, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, melanom, cancer de glandă mamară, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC, sau CLL, fie fragmente ale acestora pot fi utilizate pentru a genera anticorpii din prezenta descriere. O polipeptidă care urmează să fie utilizată pentru generarea unui anticorp din descriere poate fi parțial sau complet purificată dintr-o sursă naturală sau poate fi produsă prin tehnici de ADN recombinant.

De exemplu, un ADNc care codifică o peptidă în conformitate cu prezenta descriere, cum ar fi o peptidă conform SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 288, o polipeptidă sau o variantă sau un fragment al acesteia, poate fi exprimat în celule procariote (de exemplu, bacterii) sau în celule eucariote (de exemplu, celule de levuri, de insecte sau de mamifere), după care proteina recombinantă poate fi purificată și utilizată pentru a genera un preparat de anticorp monoclonal sau policlonal care se leagă în mod specific de polipeptida-marker de HCC, CRC, GB, GC, cancer esofagian, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, melanom, cancer de glandă mamară, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC sau CLL utilizat pentru a genera anticorpii descris în prezentul document.

Un specialist în domeniu va înțelege că generarea a două sau mai multe seturi diferite de anticorpi monoclonali sau policlonali maximizează probabilitatea de a obține un anticorp cu specificitatea și afinitatea necesare pentru utilizarea prevăzută (de exemplu, ELISA, imunohistochimie, imagistică *in vivo*, terapie cu imunotoxine). Anticorpii sunt testați pentru activitatea lor dorită prin metode cunoscute, în conformitate cu scopul pentru care urmează să fie utilizați (de exemplu, ELISA, imunohistochimie, imunoterapie etc.; pentru mai multe îndrumări privind generarea și testarea anticorpilor, a se vedea, de exemplu, Greenfield, 2014 (Greenfield, 2014)). De exemplu, anticorpii pot fi testați prin teste ELISA sau prin Western blot, prin colorarea imunohistochimică a cancerelor fixate în formol sau a secțiunilor de țesut congelate. După caracterizarea lor inițială *in vitro*, anticorpii destinați utilizării terapeutice sau diagnosticării *in vivo* sunt testați în conformitate cu metodele cunoscute de testare clinică.

Termenul „anticorp monoclonal”, așa cum este utilizat în prezentul document, se referă la un anticorp obținut dintr-o populație substanțial omogenă de anticorpi, adică anticorpii individuali care compun populația sunt identici, cu excepția unor posibile mutații naturale care pot fi prezente în cantități minore. Anticorpii monoclonali din prezentul document includ în mod specific anticorpi „himerici” în care o porțiune a lanțului greu și/sau ușor este identică sau omoloagă cu secvențele corespunzătoare din anticorpii derivați dintr-o anumită specie sau aparținând unei anumite clase sau subclase de anticorpi, în timp ce restul lanțului (lanțurilor) este identic sau omolog cu secvențele corespunzătoare din anticorpii derivați dintr-o altă specie sau aparținând unei alte clase sau subclase de anticorpi, precum și fragmente ale unor astfel de anticorpi, atâta timp cât prezintă activitatea antagonistă dorită (US 4,816,567).

Anticorpii monoclonali ai descrierii pot fi preparați prin metode cu hibridom. Într-o metodă cu hibridom, un șoarece sau un alt animal-gazdă adecvat este imunizat de obicei cu un agent imunizant pentru a obține limfocite care produc sau sunt capabile să producă anticorpi care se vor lega în mod specific de agentul imunizant. Ca alternativă, limfocitele pot fi imunizate *in vitro*.

Anticorpilor monoclonali pot fi obținuți, de asemenea, prin metode de ADN recombinant, cum ar fi cele descrise în US 4,816,567. ADN-ul care codifică anticorpilor monoclonali ai descrierii poate fi izolat și secvențiat cu ușurință folosind proceduri convenționale (de exemplu, folosind sonde de oligonucleotide care sunt capabile să se lege în mod specific de genele care codifică lanțurile grele și ușoare ale anticorpilor murini).

Metodele *in vitro* sunt, de asemenea, adecvate pentru prepararea anticorpilor monovalenți. Digestia anticorpilor pentru a produce fragmente ale acestora, în special fragmente Fab, poate fi realizată folosind tehnici de rutină cunoscute în domeniu. De exemplu, digestia poate fi efectuată utilizând papaină. Exemple de digestie cu papaină sunt descrise în WO 94/29348 și US 4,342,566. Digestia cu papaina a anticorpilor produce, de obicei, două fragmente identice de legare a antigenului, numite fragmente Fab, fiecare cu un singur situs de legare a antigenului, și un fragment Fc rezidual. Tratatamentul cu pepsină produce un fragment F(ab')₂ și un fragment pFc'.

Fragmentele de anticorpi, fie că sunt sau nu atașate la alte secvențe, pot include, de asemenea, inserții, eliminări, substituiri sau alte modificări selectate ale anumitor regiuni sau reziduuri specifice de aminoacizi, cu condiția ca activitatea fragmentului să nu fie modificată sau afectată în mod semnificativ în comparație cu anticorpii sau fragmentul de anticorp nemodificat. Aceste modificări pot conferi anumite proprietăți suplimentare, cum ar fi eliminarea/adăugarea de aminoacizi capabili de legături disulfurice, creșterea biologicității, modificarea caracteristicilor sale secretorii etc. În orice caz, fragmentul de anticorp trebuie să posede o proprietate bioactivă, cum ar fi activitatea de legare, reglarea legăturii la nivelul domeniului de legare etc. Regiunile funcționale sau active ale anticorpului pot fi identificate prin mutageneza unei regiuni specifice a proteinei, urmată de exprimarea și testarea polipeptidei exprimate. Astfel de metode sunt ușor de înțeles pentru un specialist în domeniu și pot include mutageneza situs-specifică a acidului nucleic care codifică fragmentul de anticorp.

Anticorpilor din descriere pot cuprinde, de asemenea, anticorpi umanizați sau anticorpi umani. Formele umanizate ale anticorpilor non-umani (de exemplu, murini) sunt imunoglobuline himerice, lanțuri de imunoglobuline sau fragmente ale acestora (cum ar fi Fv, Fab, Fab' sau alte subsecvențe de legare a antigenului ale anticorpilor) care conțin o secvență minimă derivată din imunoglobulina non-umană. Anticorpilor umanizați includ imunoglobuline umane (anticorp receptor) în care reziduurile dintr-o regiune determinantă complementară (CDR) a receptorului sunt înlocuite cu reziduuri dintr-o CDR a unei specii neumane (anticorp donator), cum ar fi șoarecele, șobolanul sau iepurele, având specificitatea, afinitatea și capacitatea dorite. În unele cazuri, reziduurile cadrului Fv (FR) din imunoglobulina umană sunt înlocuite cu reziduuri corespunzătoare non-umane. Anticorpilor umanizați pot cuprinde, de asemenea, reziduuri care nu se găsesc nici în anticorpii receptor, nici în secvențele CDR importate sau în secvențele-cadru. În general, anticorpii umanizați va cuprinde în mare parte cel puțin unul și, de obicei, două domenii variabile, în care toate sau aproape toate regiunile CDR corespund celor ale unei imunoglobuline neumane și toate sau aproape toate regiunile FR sunt cele ale unei secvențe consensuale de imunoglobulină umană. În mod optim, anticorpii umanizați va cuprinde, de asemenea, cel puțin o porțiune din regiunea constantă a imunoglobulinei (Fc), de obicei cea a unei imunoglobuline umane.

Metodele de umanizare a anticorpilor non-umani sunt bine cunoscute în domeniu. În general, un anticorp umanizat are una sau mai multe reziduuri de aminoacizi introduse în acesta dintr-o sursă non-umană. Aceste reziduuri de aminoacizi non-umane sunt adeseori denumite reziduuri de „import”, care sunt preluate de obicei dintr-un domeniu variabil de „import”. Umanizarea poate fi realizată în principal prin înlocuirea CDR-urilor sau a secvențelor CDR de rozătoare cu secvențele corespunzătoare ale unui anticorp uman. În consecință, astfel de anticorpi „umanizați” sunt anticorpi himerici (US 4,816,567), în care o cantitate substanțial mai mică decât un domeniu variabil uman intact a fost înlocuită cu secvența corespunzătoare dintr-o specie non-umană. În practică, anticorpilor umanizați sunt, de obicei, anticorpi umani în care unele reziduuri CDR și, eventual, unele reziduuri FR sunt înlocuite cu reziduuri din situsuri analoge din anticorpi de rozătoare.

Se pot folosi animale transgenice (de exemplu, șoareci) care sunt capabile, în urma imunizării, să producă un repertoriu complet de anticorpi umani în absența producției endogene de imunoglobuline. De exemplu, s-a descris faptul că deleția homozigotă a genei regiunii de joncțiune a lanțului greu al anticorpilor la șoarecii mutanți himerici și la șoarecii mutanți din linia germinală duce la inhibarea completă a producției endogene de anticorpi. Transferul matricei genetice de imunoglobuline din linia germinală umană în astfel de șoareci mutanți din linia germinală va determina producerea de anticorpi umani la provocarea cu antigen. Anticorpilor umani pot fi, de asemenea, produși în biblioteci de afișare de fagi.

Anticorpilor din descriere se administrează de preferință unui subiect într-un suport acceptabil din punct de vedere farmaceutic. De obicei, în formulă se utilizează o cantitate adecvată de sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic pentru a face formula izotonă. Exemplele de suport acceptabil din punct

de vedere farmaceutic includ soluție salină, soluție Ringer și soluție de dextroză. pH-ul soluției este, preferabil, de la aproximativ 5 la aproximativ 8 și, mai preferabil, de la aproximativ 7 la aproximativ 7,5. Printre alți suporturi se numără preparatele cu eliberare prelungită, cum ar fi matricile semipermeabile de polimeri hidrofobi solizi care conțin anticorpul, matrici care se prezintă sub formă de articole modelate, de exemplu, pelicule, lipozomi sau microparticule. Este evident pentru specialiștii în domeniu că anumiți purtători pot fi mai preferabili în funcție, de exemplu, de calea de administrare și de concentrația de anticorp care se administrează.

Anticorpii pot fi administrați subiectului, pacientului sau celulei prin injectare (de exemplu, intravenoasă, intraperitoneală, subcutanată, intramusculară) sau prin alte metode, cum ar fi perfuzarea, care asigură livrarea lor în fluxul sanguin într-o formă eficace. Anticorpii pot fi, de asemenea, administrați pe căi intratumorale sau peritumorale, pentru a exercita efecte terapeutice atât locale, cât și sistemice. Se preferă injectarea locală sau intravenoasă.

Dozele și programele eficace de administrare a anticorpilor pot fi determinate în mod empiric, iar efectuarea unor astfel de determinări este de competența specialistului în domeniu. Specialiștii în domeniu vor înțelege că doza de anticorp care trebuie administrată va varia în funcție, de exemplu, de subiectul care va primi anticorpul, de calea de administrare, de tipul special de anticorp utilizat și de alte medicamente care se administrează. O doză zilnică tipică a anticorpului utilizat singur poate varia de la aproximativ 1 μg/kg până la 100 mg/kg de greutate corporală sau mai mult pe zi, în funcție de factorii menționați mai sus. În urma administrării unui anticorp, de preferință pentru a trata HCC, CRC, GB, GC, cancerului esofagian, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, melanom, cancer de glandă mamară, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC sau CLL, eficacitatea anticorpului terapeutic poate fi evaluată în diverse moduri bine cunoscute de către practicianul experimentat. De exemplu, dimensiunea, numărul și/sau distribuția cancerului la un subiect care primește tratament pot fi monitorizate cu ajutorul tehnicilor standard de imagistică tumorală. Un anticorp administrat în scop terapeutic care oprește creșterea tumorii, determină reducerea tumorii și/sau previne dezvoltarea de noi tumori, în comparație cu evoluția bolii care ar apărea în absența administrării anticorpului, este un anticorp eficace pentru tratarea cancerului.

Un alt aspect al descrierii este acela de a furniza o metodă de producere a unui receptor solubil de celule T (sTCR) care recunoaște un complex peptidă-MHC specific. Astfel de receptori solubili de celule T pot fi generați din clone specifice de celule T, iar afinitatea lor poate fi crescută prin mutageneză care vizează regiunile care determină complementaritatea. În scopul selectării receptorilor de celule T, se poate utiliza afișarea de fagi (US 2010/0113300, (Liddy et al., 2012)). În scopul stabilizării receptorilor de celule T în timpul afișării de fag și în cazul utilizării practice ca medicament, lanțul alfa și lanțul beta pot fi legate, de exemplu, prin legături disulfidice non-native, alte legături covalente (receptor de celule T cu un singur lanț) sau prin domenii de dimerizare (Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999). Receptorul de celule T poate fi legat de toxine, medicamente, citokine (a se vedea, de exemplu, US 2013/0115191) și domenii care recrutează celulele efectoare, cum ar fi un domeniu anti-CD3 etc., pentru a executa anumite funcții asupra celulelor-țintă. În plus, ar putea fi exprimat în celulele T utilizate pentru transferul adoptiv. Informații suplimentare pot fi găsite în WO 2004/033685A1 și WO 2004/074322A1. O combinație de sTCR-uri este descrisă în WO 2012/056407A1. Alte metode de producție sunt descrise în WO 2013/057586A1.

În plus, peptidele și/sau TCR-urile sau anticorpii sau alte molecule de legare din prezenta descriere pot fi utilizate pentru a verifica diagnosticul de cancer pus de un anatomopatolog pe baza unui eșantion biopsiat.

Anticorpii sau TCR-urile pot fi, de asemenea, utilizate pentru teste de diagnosticare *in vivo*. În general, anticorpul este marcat cu un radionucleotid (cum ar fi ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^3H , ^{32}P sau ^{35}S), astfel încât tumoarea să poată fi localizată prin imunoscintigrafie. Într-una dintre concretizări, anticorpii sau fragmentele acestora se leagă de domeniile extracelulare a două sau mai multe ținte ale unei proteine selectate din grupul format din proteinele menționate mai sus, iar valoarea afinității (Kd) este mai mică de $1 \times 10^{-6} \text{ M}$.

Anticorpii pentru diagnosticare pot fi marcați cu sonde care pot fi detectate prin diferite metode de imagistică. Metodele de detectare a sondelor includ, fără a se limita la acestea, microscopia fluorescentă, luminoasă, confocală și electronică; imagistica prin rezonanță magnetică și spectroscopia; fluoroscopia, tomografia computerizată și tomografia cu emisii de pozitroni. Sondele adecvate includ, dar nu se limitează la fluoresceină, rodamină, eozină și alți fluorofori, radioizotopi, aur, gadolinii și alte lantanide, fier paramagnetic, fluor-18 și alți radionuclizi emițători de pozitroni. În plus, sondele pot fi bifuncționale sau multifuncționale și pot fi detectabile prin mai mult de una dintre metodele enumerate. Acești anticorpi pot fi marcați direct sau indirect cu sondele menționate. Atașarea sondelor la anticorpi include atașarea covalentă a sondei, încorporarea sondei în anticorp și atașarea covalentă a unui compus

chelator pentru legarea sondei, printre alte metode bine cunoscute în domeniu. Pentru imunohistochimie, eșantionul de țesut bolnav poate fi proaspăt sau congelat sau poate fi inclus în parafină și fixat cu un conservant, cum ar fi formalina. Secțiunea fixată sau înglobată conține eșantionul și este pusă în contact cu un anticorp primar marcat și un anticorp secundar, anticorpii fiind utilizați pentru a detecta exprimarea proteinelor *in situ*.

Un alt aspect al prezentei descrieri include o metodă *in vitro* pentru producerea de celule T activate, metoda cuprinzând punerea în contact a celulelor T *in vitro* cu molecule MHC umane încărcate cu antigen, exprimate pe suprafața unei celule prezentatoare de antigen adecvate, pentru o perioadă de timp suficientă pentru a activa celula T într-o manieră specifică antigenului, în care antigenul este o peptidă descrisă în prezentul document. De preferință, se utilizează o cantitate suficientă de antigen cu o celulă prezentatoare de antigen.

De preferință, celulei de mamifer îi lipsește sau are un nivel sau o funcție redusă a transportatorului de peptide TAP. Celulele adecvate care nu au transportorul de peptide TAP includ celulele T2, RMA-S și *Drosophila*. TAP este transportatorul asociat cu procesarea antigenului.

Linia celulară umană T2 cu deficit de încărcare a peptidelor este disponibilă la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, SUA, cu nr. de catalog CRL 1992; linia celulară de *Drosophila* Schneider line 2 este disponibilă la ATCC cu nr. de catalog CRL 19863; linia celulară RMA-S de șoarece este descrisă în Ljunggren et al. (Ljunggren și Karre, 1985).

De preferință, înainte de transfectare, celula-gazdă nu exprimă practic nicio moleculă MHC de clasă I. Se preferă, de asemenea, ca celula stimulatoră să exprime o moleculă importantă pentru furnizarea unui semnal costimulator pentru celulele T, cum ar fi oricare dintre B7.1, B7.2, ICAM-1 și LFA 3. Secvențele de acid nucleic ale numeroaselor molecule MHC de clasă I și ale moleculelor costimulatoare sunt disponibile în mod public în bazele de date GenBank și EMBL.

În cazul în care un epitop MHC de clasă I este utilizat ca antigen, celulele T sunt celule T CD8- pozitive.

În cazul în care o celulă prezentatoare de antigen este transfectată pentru a exprima un astfel de epitop, de preferință, celula cuprinde un vector de exprimare capabil să exprime o peptidă care conține SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 288 sau o variantă a secvenței de aminoacizi a acesteia.

O serie de alte metode pot fi utilizate pentru a genera celule T *in vitro*. De exemplu, în generarea de CTL-uri se pot utiliza limfocite autologe care infiltrază tumorile. Plebanski et al. (Plebanski et al., 1995) au utilizat limfocite autologe din sânge periferic (PLB) în prepararea celulelor T. În plus, este posibilă producerea de celule T autologe prin pulsarea celulelor dendritice cu peptide sau polipeptide, sau prin infectarea cu virusuri recombinante. De asemenea, celulele B pot fi utilizate în producția de celule T autologe. În plus, macrofagele pulsate cu peptide sau polipeptide sau infectate cu un virus recombinant pot fi utilizate la prepararea de celule T autologe. S. Walter et al. (Walter et al., 2003) descriu amorsarea *in vitro* a celulelor T prin utilizarea de celule prezentatoare de antigen artificiale (aAPC), aceasta reprezentând, de asemenea, o modalitate potrivită de generare de celule T pentru peptida aleasă. În prezenta descriere, aAPC-urile au fost generate prin cuplarea complexelor MHC-peptidă preformate la suprafața particulelor de polistiren (microbile) prin biochimie biotină:streptavidină. Acest sistem permite controlul exact al densității MHC pe aAPC-uri, ceea ce permite obținerea selectivă de răspunsuri de celule T specifice antigenului cu aciditate mare sau mică, cu eficacitate ridicată, din probe de sânge. Pe lângă complexe MHC:peptidă, celulele aAPC trebuie să poarte alte proteine cu activitate de costimulare, cum ar fi anticorpi anti-CD28 cuplați pe suprafețele lor. În plus, astfel de sisteme bazate pe aAPC-uri necesită adesea adăugarea de factori solubili corespunzători, de exemplu citokine, cum ar fi interleukina-12.

La prepararea celulelor T se pot utiliza, de asemenea, celule alogene, iar o metodă este descrisă în detaliu în WO 97/26328. De exemplu, pe lângă celulele *Drosophila* și celulele T2, pot fi utilizate și alte celule pentru a prezenta antigeni, cum ar fi celule CHO, celule de insecte infectate cu baculovirus, bacteriile, levuri și celule-țintă infectate cu vaccinia. În plus, se pot utiliza virusuri de plante (vezi, de exemplu, Porta et al. (Porta et al., 1994), care descriu dezvoltarea virusului mozaicului din *Vigna unguiculata* ca fiind un sistem cu productivitate ridicată pentru prezentarea de peptide străine.

Celulele T activate care sunt direcționate împotriva peptidelor din descriere sunt utile în terapie. Astfel, un alt aspect al descrierii furnizează celule T activate care pot fi obținute prin metodele de mai sus ale descrierii.

Celulele T activate, care sunt produse prin metoda de mai sus, vor recunoaște selectiv o celulă care exprimă în mod aberant o polipeptidă care cuprinde o secvență de aminoacizi din SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 288.

De preferință, celula T recunoaște celula prin interacțiune, prin intermediul TCR-ului său, cu complexul HLA-peptidă (de exemplu, legare). Celulele T sunt utile într-o metodă de distrugere a

celulelor-țintă la un pacient ale cărui celule-țintă exprimă în mod aberant o polipeptidă care cuprinde o secvență de aminoacizi din descriere, în care pacientului i se administrează un număr eficient de celule T activate. Celulele T care sunt administrate pacientului pot fi derivate de la pacient și activate așa cum s-a descris mai sus (adică sunt celule T autologe). Alternativ, celulele T nu provin de la pacient, ci de la un alt individ. Desigur, este de preferat ca sursa să fie un individ sănătos. Prin „individ sănătos”, inventatorii înțeleg că individul este, în general, într-o stare de sănătate bună, de preferință are un sistem imunitar competent și, mai ales, nu suferă de nicio boală care poate fi ușor testată și detectată.

In vivo, celulele-țintă pentru celulele T CD8-pozitive conform prezentei descrieri pot fi celule ale tumorii (care uneori exprimă MHC de clasă II) și/sau celule stromale care înconjoară tumoarea (celule tumorale) (care uneori exprimă, de asemenea, MHC de clasă II; (Dengjel et al., 2006)).

Celulele T din prezenta descriere pot fi utilizate ca ingrediente active ale unei compoziții terapeutice. În consecință, descrierea furnizează și o metodă de distrugere a celulelor țintă la un pacient ale cărui celule țintă exprimă aberant o polipeptidă care conține o secvență de aminoacizi din descriere, metoda constând în administrarea unui număr eficient de celule T pacientului, așa cum s-a arătat mai sus.

Prin „exprimată aberant”, inventatorii înțeleg, de asemenea, că polipeptida este supraexprimată în comparație cu nivelurile normale de exprimare sau că gena este silențioasă în țesutul din care provine tumoarea, însă este exprimată în tumoare. Prin „supraexprimată”, inventatorii înțeleg că polipeptida este prezentă la un nivel de cel puțin 1,2 ori mai mare decât cel prezent în țesutul normal; preferabil, la un nivel de cel puțin 2 ori și, mai preferabil, la un nivel de cel puțin 5 ori sau 10 ori mai mare decât cel prezent în țesutul normal.

Celulele T pot fi obținute prin metode cunoscute în domeniu, de exemplu cele descrise mai sus.

Protocoloale pentru acest așa-numit transfer adoptiv de celule T sunt bine cunoscute în domeniu. Recenzii pot fi găsite în: Gattioni et al. și Morgan et al. (Gattinoni et al., 2006; Morgan et al., 2006).

Un alt aspect al prezentei descrieri include utilizarea peptidelor complexate cu MHC pentru a genera un receptor de celule T al cărui acid nucleic este clonat și este introdus într-o celulă-gazdă, de preferință o celulă T. Această celulă T modificată poate fi apoi transferată unui pacient pentru tratarea cancerului.

Orice moleculă a descrierii, și anume peptida, acidul nucleic, anticorpus, vectorul de exprimare, celula, celula T activată, receptorul de celule T sau acidul nucleic care o codifică, este utilă pentru tratarea tulburărilor caracterizate prin faptul că celulele scapă unui răspuns imunitar. În consecință, orice moleculă din prezenta descriere poate fi utilizată ca medicament sau pentru fabricarea unui medicament. Molecula poate fi utilizată ca atare sau combinată cu altă (alte) moleculă (molecule) a(le) descrierii sau cu o moleculă (molecule) cunoscută (cunoscute).

Prezenta descriere furnizează, de asemenea, un medicament care este util în tratarea cancerului, în special HCC, CRC, GB, GC, cancer esofagian, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, melanom, cancer de glandă mamară, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC, sau CLL și alte malignități.

Prezenta descriere se referă, de asemenea, la o trusă care cuprinde:

(a) un recipient care conține o compoziție farmaceutică așa cum este descrisă mai sus, în soluție sau sub formă liofilizată;

(b) opțional, un al doilea recipient care conține un diluant sau o soluție de reconstituire pentru formula liofilizată; și

(c) opțional, instrucțiuni pentru (i) utilizarea soluției sau (ii) reconstituirea și/sau utilizarea formulei liofilizate.

Trusa poate conține suplimentar și una sau mai multe din următoarele: (iii) soluție tampon, (iv) dizolvant, (v) filtru, (vi) ac sau (v) seringă. Recipientul este în mod preferabil o sticlă, o fiolă, o seringă sau o eprubetă și poate fi un recipient reutilizabil. Compoziția farmaceutică este, de preferință, liofilizată.

Trusele din prezenta descriere cuprind, de preferință, o formulă liofilizată a prezentei descrieri într-un recipient adecvat și instrucțiuni pentru reconstituirea și/sau utilizarea acesteia. Recipientele adecvate includ, de exemplu, sticle, flacoane (de exemplu, flacoane cu două camere), seringi (cum ar fi seringile cu două camere) și eprubete. Recipientul poate fi format dintr-o varietate de materiale, cum ar fi sticla sau plasticul. De preferință, trusa și/sau recipientul conțin instrucțiuni pe sau asociate cu recipientul care indică instrucțiunile de reconstituire și/sau de utilizare. De exemplu, eticheta poate indica dacă formula liofilizată trebuie reconstituită la o concentrație a peptidelor descrisă anterior. În plus eticheta poate indica dacă formula este utilizabilă sau destinată pentru administrare subcutanată.

Recipientul care conține formula poate fi o fiolă pentru utilizări multiple, care permite administrarea repetată (de exemplu, 2-6 administrări) a formulei reconstituite. Trusa poate include în plus și un al doilea recipient care conține un dizolvant adecvat (de exemplu, soluție de bicarbonat de sodiu).

La amestecarea dizolvantului cu formula liofilizată, concentrația finală de peptide în formula reconstituită este preferabil de cel puțin 0,15 mg/ml/peptidă (=75 μg) și, preferabil, nu depășește 3

mg/ml/peptidă (=1500 µg). Trusa poate include, de asemenea, alte materiale de dorit din punct de vedere comercial și al utilizatorului, inclusiv alți tampoane, diluanți, filtre, ace, seringi și prospecte cu instrucțiuni de utilizare.

Trusele din prezenta descriere pot avea un singur recipient care conține formularea compozițiilor farmaceutice conform prezentei descrieri cu sau fără alte componente (de exemplu, alți compuși sau compoziții farmaceutice din acești alți compuși) sau pot avea recipiente distincte pentru fiecare componentă.

De preferință, trusele descrierii includ o formulare a descrierii ambalată pentru a fi utilizată în combinație cu co-administrarea unui al doilea compus (cum ar fi adjuvanți (de exemplu, GM-CSF), un agent chimioterapeutic, un produs natural, un hormon sau un antagonist, un agent sau un inhibitor anti-angiogeneză, un agent care induce apoptoza sau un chelator) sau o compoziție farmaceutică a acestuia. Componentele trusei pot fi precomplexate sau fiecare componentă poate fi într-un recipient separat și distinct înainte de a fi administrată unui pacient. Componentele trusei pot fi furnizate în una sau mai multe soluții lichide, preferabil, o soluție apoasă, mai preferabil, o soluție apoasă sterilă. Componentele trusei pot fi, de asemenea, furnizate sub formă de solide, care pot fi transformate în lichide prin adăugarea de solvenți adecvați, care sunt de preferință furnizate într-un alt recipient distinct.

Recipientul unei truse terapeutice poate fi un flacon, o eprubetă, un balon, o sticlă, o seringă sau orice alt mijloc de înglobare a unui solid sau a unui lichid. De obicei, atunci când există mai mult de o componentă, trusa va conține un al doilea flacon sau un alt recipient, care permite o dozare separată. Trusa poate conține, de asemenea, un alt recipient pentru un lichid acceptabil din punct de vedere farmaceutic. De preferință, o trusă terapeutică va conține un aparat (de exemplu, unul sau mai multe ace, seringi, picături pentru ochi, pipetă etc.), care permite administrarea agenților din descriere care sunt componente ale prezentei truse.

Prezenta formulă este una care este adecvată pentru administrarea peptidelor pe orice cale acceptabilă, cum ar fi cea orală (enterală), nazală, oftalmică, subcutanată, intradermică, intramusculară, intravenoasă sau transdermică. De preferință, administrarea este s.c. și, cel mai preferabil, administrarea i.d. poate fi efectuată cu ajutorul unei pompe de perfuzare.

Deoarece peptidele din prezenta descriere au fost izolate din HCC, CRC, GB, GC, cancer esofagian, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, melanom, cancer de glandă mamară, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC și CLL, medicamentul din prezenta descriere este utilizat de preferință în tratamentul pentru HCC, CRC, GB, GC, cancer esofagian, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, melanom, cancer de glandă mamară, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC și CLL.

Pe lângă utilitatea lor în tratamentul cancerului, peptidele care fac obiectul prezentei descrieri sunt utile și în scop diagnostic. Deoarece peptidele au fost generate din celule de HCC, CRC, GB, GC, cancer esofagian, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, melanom, cancer de glandă mamară, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC și CLL și deoarece s-a stabilit că aceste peptide nu sunt prezente în țesuturile normale sau sunt prezente la niveluri mai scăzute în țesuturile normale, aceste peptide pot fi utilizate pentru a diagnostica prezența unui cancer.

Prezența peptidelor revendicate pe biopsiile de țesut în eșantioanele de sânge poate ajuta un patolog în diagnosticarea cancerului. Detectarea anumitor peptide cu ajutorul anticorpilor, al spectrometriei de masă sau al altor metode cunoscute în domeniu poate informa patologul că eșantionul de țesut este malign, inflamă sau, în general, bolnav, sau poate fi utilizată ca biomarker pentru HCC, CRC, GB, GC, cancer esofagian, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, melanom, cancer de glandă mamară, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC sau CLL. Prezența unor grupuri de peptide poate permite clasificarea sau subclasificarea țesuturilor bolnave.

Detectarea peptidelor pe eșantioane de țesut bolnav poate permite luarea unei decizii cu privire la beneficiile terapiei care implică sistemul imunitar, în special dacă se știe sau se așteaptă ca limfocitele T să fie implicate în mecanismul de acțiune. Pierderea exprimării MHC este un mecanism bine descris prin care celulele maligne infectate scapă de imunosupraveghere.

Astfel, prezența peptidelor arată că acest mecanism nu este exploatat de celulele analizate.

Peptidele din prezenta descriere ar putea fi utilizate pentru a analiza răspunsurile limfocitelor împotriva acestor peptide, cum ar fi răspunsurile celulelor T sau răspunsurile anticorpilor împotriva peptidei sau a peptidei complexate cu molecule MHC. Aceste răspunsuri limfocitare pot fi utilizate ca markeri de prognostic pentru a lua o decizie privind etapele ulterioare de tratament. Aceste răspunsuri pot fi, de asemenea, utilizate ca markeri de răspuns surogat în abordările imunoterapeutice care au drept scop inducerea de răspunsuri limfocitare prin diferite mijloace, de exemplu, vaccinare cu proteine, acizi nucleici, materiale autologe, transfer adoptiv de limfocite. În cadrul terapiei genice, răspunsurile limfocitelor împotriva peptidelor pot fi luate în considerare în evaluarea efectelor secundare. Monitorizarea răspunsurilor limfocitare ar putea fi, de asemenea, un instrument valoros pentru

examinările de urmărire a terapiilor de transplant, de exemplu pentru detectarea bolilor grefă versus gazdă și gazdă versus grefă.

FIGURI

Figura 1 prezintă suprareprezentarea diferitelor peptide în diferite țesuturi canceroase în comparație cu țesuturile normale. Analizele au inclus date din peste 170 de eșantioane de țesut normal și 376 de eșantioane de cancer. Sunt prezentate doar eșantioanele în care s-a constatat prezența peptidei. Figura 1A) Genă: CENPE, Peptidă: KLQEKIQEL (SEQ ID NO: 1), Țesuturi (de la stânga la dreapta): 4 linii celulare de cancer leucocitar, 1 linie celulară de cancer pancreatic, 1 linie celulară de melanom, 2 eșantioane de țesut normal (1 glandă suprarenală, 1 splină), 31 de eșantioane de țesut canceros primar (1 cancer cerebral, 4 cancere de colon, 1 cancer esofagian, 1 cancer renal, 2 cancere hepatice, 16 cancere pulmonare, 4 cancere ovariene, 1 cancer rectal, 1 cancer gastric), Figura 1B) Genă: KIF15, Peptidă: QLIEKNWLL (SEQ ID NO: 10), Țesuturi (de la stânga la dreapta): 5 linii celulare de cancer leucocitar, 1 linie celulară de cancer pancreatic, 1 linie celulară de leucemie mieloidă, 1 eșantion de țesut normal (1 glandă suprarenală), 29 de eșantioane de țesut canceros (4 cancere de colon, 2 cancere esofagiene, 1 cancer leucocitar, 1 cancer hepatic, 10 cancere pulmonare, 11 cancere ovariene), Figura 1C) Genă: HAVCR1, Peptidă: LLDPKTIFL (SEQ ID NO: 11), Țesuturi (de la stânga la dreapta): 1 linie celulară de cancer renal, 13 probe de țesuturi canceroase (8 cancere renale, 1 cancer hepatic, 2 cancere pulmonare, 2 cancere rectale), Figura 1D) Genă: RPGRIP1L, Peptidă: RLHDENILL (SEQ ID NO: 13), Țesuturi (de la stânga la dreapta): 1 linie celulară de cancer renal, 1 linie celulară de cancer de prostată, 1 linie celulară de melanom, 50 de eșantioane de țesuturi canceroase (4 cancere cerebrale, 1 cancer de colon, 2 cancere esofagiene, 3 cancere renale, 2 cancere hepatice, 23 de cancere pulmonare, 7 cancere ovariene, 2 cancere pancreatice, 2 cancere de prostată, 3 cancere rectale, 1 cancer gastric). Figurile 1E – 1J arată suprareprezentarea diferitelor peptide în diferite țesuturi canceroase în comparație cu țesuturile normale. Analizele au inclus date din peste 320 de eșantioane de țesut normal și 462 de eșantioane de cancer. Sunt prezentate doar eșantioanele în care s-a constatat prezența peptidei. Figura 1E) Genă: DNAH14, Peptidă: SVLEKEIYSI (SEQ ID NO: 2), Țesuturi (de la stânga la dreapta): 4 linii celulare (3 celule sanguine, 1 pancreas, 2 țesuturi normale (1 ganglion limfatic, 1 trahee), 52 de țesuturi canceroase (2 cancere de canal biliar, 1 cancer de celule mieloide, 3 cancere de leucemie leucocitară, 5 cancere de glandă mamară, 1 cancer esofagian, 1 cancer de esofag și stomac, 1 cancer de vezică biliară, 4 cancere de colon, 7 cancere pulmonare, 6 cancere de ganglioni limfatici, 7 cancere ovariene, 4 cancere de prostată, 4 cancere de piele, 2 cancere de vezică urinară, 4 cancere de uter), Figura 1F) Gene: MAGEA3, MAGEA6, Peptidă: KIWEELSVLEV (SEQ ID NO: 40), Țesuturi (de la stânga la dreapta): 8 țesuturi canceroase (1 cancer hepatic, 3 cancere pulmonare, 2 cancere de piele, 1 cancer de stomac, 1 cancer de vezică urinară), Figura 1G) Genă: HMX1, Peptidă: FLIENLLAA (SEQ ID NO: 67), Țesuturi (de la stânga la dreapta): 7 țesuturi canceroase (4 cancere cerebrale, 2 cancere pulmonare, 1 cancer uterin), Figura 1H) Genă: CCDC138, Peptidă: FLLEREQLL (SEQ ID NO: 84), Țesuturi (de la stânga la dreapta): 3 linii celulare (2 celule sanguine, 1 piele), 24 de țesuturi canceroase (1 cancer de celule mieloide, 3 cancere de leucemie leucocitară, 1 cancer de măduvă osoasă, 1 cancer de glandă mamară, 1 cancer renal, 2 cancere de colon, 3 cancere rectale, 1 cancer pulmonar, 7 cancere de ganglioni limfatici, 3 cancere de vezică urinară, 1 cancer uterin), Figura 1I) Genă: CLSPN, Peptidă: SLLNQPKAV (SEQ ID NO: 235), Țesuturi (de la stânga la dreapta): 13 linii celulare (3 celule sanguine, 2 rinichi, 8 pancreas), 30 de țesuturi canceroase (1 cancer de celule mieloide, 1 cancer de leucemie leucocitară, 2 cancere cerebrale, 2 cancere de glandă mamară, 2 cancere esofagiene, 1 cancer de vezică biliară, 1 cancer rectal, 2 cancere hepatice, 4 cancere pulmonare, 5 cancere de ganglioni limfatici, 2 cancere ovariene, 2 cancere de piele, 4 cancere de vezică urinară, 1 cancer uterin), Figura 1J) Genă: SPC25, Peptidă: GLAEFQENV (SEQ ID NO: 243), Țesuturi (de la stânga la dreapta): 3 linii celulare (1 celule sanguine, 1 rinichi, 1 pancreas), 67 de țesuturi canceroase (1 cancer de canal biliar, 4 cancere de leucemie leucocitară, 1 cancer de celule mieloide, 2 cancere cerebrale, 3 cancere de glandă mamară, 4 cancere esofagiene, 2 cancere de vezică biliară, 2 cancere de colon, 1 cancer rectal, 2 cancere hepatice, 15 cancere pulmonare, 8 cancere de ganglioni limfatici, 9 cancere ovariene, 3 cancere de piele, 4 cancere de vezică urinară, 6 cancere uterine).

Figura 2 prezintă exemple de profiluri de exprimare (exprimare relativă în comparație cu rinichiul normal) ale genelor-sursă din prezenta descriere care sunt puternic supraexprimate sau exclusiv exprimate în diferite tipuri de cancer în comparație cu un panel de țesuturi normale. Figura 2A) PRIM2 - Țesuturi (de la stânga la dreapta): glandă suprarenală, arteră, măduvă osoasă, creier (întreg), glandă mamară, colon, esofag, inimă, rinichi (triplicat), leucocite, ficat, plămân, ganglion limfatic, ovar, pancreas, placenta, prostată, glandă salivară, mușchi scheletic, piele, intestin subțire, splină, splină, stomac, testicul, timus, glandă tiroidă, vezica urinară, col uterin, uter, venă (fiecare eșantion normal reprezintă un grup de mai mulți donatori), 22 de eșantioane individuale de cancer de prostată, Figura 2B) CHEK1 - Țesuturi (de la stânga la dreapta): glandă suprarenală, arteră, măduvă osoasă, creier (întreg),

glandă mamară, colon, esofag, inimă, rinichi (triplicat), leucocite, ficat, plămân, ganglion limfatic, ovar, pancreas, placentă, prostată, glandă salivară, mușchi scheletic, piele, intestin subțire, splină, stomac, testicul, timus, glandă tiroidă, vezică urinară, col uterin, uter, venă (fiecare eșantion normal reprezintă un grup de mai mulți donatori), 3 eșantioane individuale de colon normal, 10 eșantioane individuale de cancer colorectal, Figura 2C) TTC30A - Țesuturi (de la stânga la dreapta): glandă suprarenală, arteră, măduvă osoasă, creier (întreg), glandă mamară, colon, esofag, inimă, rinichi (triplicat), leucocite, ficat, plămân, ganglion limfatic, ovar, pancreas, placentă, prostată, glandă salivară, mușchi scheletic, piele, intestin subțire, splină, splină, stomac, testicul, timus, glandă tiroidă, vezica urinară, col uterin, uter, venă (fiecare eșantion normal reprezintă un grup de mai mulți donatori), 30 de eșantioane individuale de cancer cerebral, Figura 2D) TRIP13 - Țesuturi (de la stânga la dreapta): glandă suprarenală, arteră, măduvă osoasă, creier (întreg), sân, colon, esofag, inimă, rinichi (în trei exemplare), leucocite, ficat, plămân, ganglion limfatic, ovar, pancreas, placentă, prostată, glandă salivară, mușchi scheletic, piele, intestin subțire, splină, stomac, testicul, timus, glandă tiroidă, vezica urinară, col uterin, uter, venă (fiecare eșantion normal reprezintă un grup de mai mulți donatori), 1 eșantion individual de plămân normal, 38 de eșantioane individuale de cancer pulmonar, Figura 2E) MXRA5 - Țesuturi (de la stânga la dreapta): glandă suprarenală, arteră, măduvă osoasă, creier (întreg), glandă mamară, colon, esofag, inimă, rinichi (triplicat), leucocite, ficat, plămân, ganglion limfatic, ovar, pancreas, placentă, prostată, glandă salivară, mușchi scheletic, piele, intestin subțire, splină, stomac, testicul, timus, glandă tiroidă, vezica urinară, col uterin, uter, venă (fiecare eșantion normal reprezintă un grup de mai mulți donatori), 9 eșantioane individuale de cancer pancreatic. Figurile 2F – 2H prezintă exemple de profiluri de exprimare ale genelor-sursă din prezenta descriere care sunt puternic supraexprimate sau exclusiv exprimate în cancer într-un panel de țesuturi normale (bare albe) și în diferite eșantioane de cancer (bare negre). Figura 2F) MMP11, MMP13 (SEQ ID NO: 24) - Țesuturi (de la stânga la dreapta): 80 de eșantioane de țesut normal (6 artere, 2 celule sanguine, 2 creiere, 1 inimă, 2 ficiți, 3 plămâni, 2 vene, 1 țesut adipos, 1 glandă suprarenală, 5 măduve osoase, 1 cartilaj, 1 colon, 1 esofag, 2 ochi, 2 vezici biliare, 1 rinichi, 6 ganglioni limfatici, 4 pancreasuri, 2 nervi periferici, 2 glande hipofizare, 1 rect, 2 glande salivare, 2 mușchi scheletici, 1 piele, 1 intestin subțire, 1 splină, 1 stomac, 1 glandă tiroidă, 7 trahei, 1 vezică urinară, 1 glandă mamară, 5 ovare, 5 placentă, 1 prostată, 1 testicul, 1 timus, 1 uter), 50 de eșantioane de cancer (10 cancere de glandă mamară, 4 cancere de canal biliar, 6 cancere de vezică biliară, 11 cancere esofagiene, 10 cancere de vezică urinară, 10 cancere uterine), Figura 2G) HORMAD1 (SEQ ID NO: 168) - Țesuturi (de la stânga la dreapta): 80 de eșantioane de țesut normal (6 artere, 2 celule sanguine, 2 creiere, 1 inimă, 2 ficiți, 3 plămâni, 2 vene, 1 țesut adipos, 1 glandă suprarenală, 5 măduve osoase, 1 cartilaj, 1 colon, 1 esofag, 2 ochi, 2 vezici biliare, 1 rinichi, 6 ganglioni limfatici, 4 pancreasuri, 2 nervi periferici, 2 glande hipofizare, 1 rect, 2 glande salivare, 2 mușchi scheletici, 1 piele, 1 intestin subțire, 1 splină, 1 stomac, 1 glandă tiroidă, 7 trahei, 1 vezică urinară, 1 glandă mamară, 5 ovare, 5 placentă, 1 prostată, 1 testicul, 1 timus, 1 uter), 41 de eșantioane de cancer (10 cancere de glandă mamară, 10 cancere de piele, 11 cancere pulmonare non-microcelulare, 10 cancere pulmonare microcelulare), Figura 2H) IGF2BP1, IGF2BP3 (SEQ ID NO: 274) - Țesuturi de la stânga la dreapta): 80 de eșantioane de țesut normal (6 artere, 2 celule sanguine, 2 creiere, 1 inimă, 2 ficiți, 3 plămâni, 2 vene, 1 țesut adipos, 1 glandă suprarenală, 5 măduve osoase, 1 cartilaj, 1 colon, 1 esofag, 2 ochi, 2 vezici biliare, 1 rinichi, 6 ganglioni limfatici, 4 pancreasuri, 2 nervi periferici, 2 glande hipofizare, 1 rect, 2 glande salivare, 2 mușchi scheletici, 1 piele, 1 intestin subțire, 1 splină, 1 stomac, 1 glandă tiroidă, 7 trahei, 1 vezică urinară, 1 glandă mamară, 5 ovare, 5 placentă, 1 prostată, 1 testicul, 1 timus, 1 uter), 53 de eșantioane de cancer (4 cancere de canal biliar, 6 cancere de vezică biliară, 10 cancere de ganglioni limfatici, 12 cancere ovariene, 11 cancere esofagiene, 10 cancere pulmonare).

Figura 3 prezintă exemple de date privind imunogenitatea: rezultate ale citometriei în flux după colorarea multimerului specific peptidelor.

Figura 4A-R prezintă în partea superioară: intensitățile mediane ale semnalului MS din măsurătorile de replicare tehnică sunt reprezentate sub formă de puncte colorate pentru eșantioanele singulare HLA-A*02 pozitive normale (puncte verzi sau gri) și pentru eșantioanele tumorale (puncte roșii) pe care a fost detectată peptida. Eșantioanele tumorale și normale sunt grupate în funcție de organul de origine, iar diagramele „casetă și mustăți” reprezintă mediana, percentila 25 și 75 (casetă), precum și minimul și maximul (mustățile) intensităților de semnal normalizate pe mai multe eșantioane. Organele normale sunt ordonate în funcție de categoriile de risc (celule sanguine, sistem cardiovascular, creier, ficat, plămâni: risc ridicat, puncte de culoare verde închis; organe de reproducere, glandă mamară, prostată: risc scăzut, puncte gri; toate celelalte organe: risc mediu; puncte de culoare verde deschis). Partea de jos: Frecvența relativă de detectare a peptidelor în fiecare organ este prezentată sub formă de grafic „spineplot”. Numerele de sub panou indică numărul de eșantioane în care a fost detectată peptida din numărul total de eșantioane analizate pentru fiecare organ (N = 298 pentru eșantioane normale, N =

461 pentru eșantioane tumorale). Dacă peptida a fost detectată pe un eșantion, dar nu a putut fi cuantificată din motive tehnice, eșantionul este inclus în această reprezentare a frecvenței de detectare, însă nu se afișează niciun punct în partea superioară a figurii. Țesuturi (de la stânga la dreapta): eșantioane normale: arteră; celule sanguine; creier; inimă; ficat; plămân; venă; adipose: țesut adipos; adren.gl.: glandă suprarenală; BM: măduvă osoasă; colorect: colon și rect; duod: duoden; esoph: esofag; gallb: vezică biliară; LN: ganglion limfatic; panc: pancreas; parathy: glanda paratiroidă; perit: peritoneu; pituit: hipofiză; sal. gland: glandă salivară; skel.mus: mușchi scheletic; piele; sm.int: intestin subțire; splină; stomac; tiroidă; trahee; ureter; vezică urinară; glandă mamară; ovar; placentă; prostată; testicul; timus; uter. Eșantioane tumorale: AML: leucemie mieloidă acută; PCA: cancer de prostată; BRCA: cancer de glandă mamară; CLL: leucemie limfocitară cronică; CRC: cancer colorectal; GALB: cancer de vezică biliară; HCC: carcinom hepatocelular; MEL: melanom; NHL: limfom non-Hodgkin; OC: cancer ovarian; OSCAR: cancer esofagian; OSC_GC: cancer esofagian/gastric; PC: cancer pancreatic; GB: glioblastom; GC: cancer gastric; NSCLC: cancer pulmonar non-microcelular; RCC: carcinom cu celule renale; SCLC: cancer pulmonar microcelular; UBC: carcinom de vezică urinară; UEC: cancer uterin și endometrial.

Figura 5A-R prezintă exemple de profiluri de exprimare ale genelor-sursă ale prezentei descrieri care sunt supraexprimate în diferite eșantioane de cancer. Eșantioanele tumorale (punctele roșii) și cele normale (punctele verzi sau gri) sunt grupate în funcție de organul de origine, iar diagramele „casetă și mustăți” reprezintă valorile RPKM mediane, percentila 25 și 75 (casetă) și valorile minime și maxime (mustățile). Organele normale sunt ordonate în funcție de categoriile de risc. RPKM = citiri per kilobază per milion de citiri cartografiate. Eșantioane normale: arteră; celule sanguine; creier; inimă; ficat; plămân; venă; adipose: țesut adipos; adren.gl.: glandă suprarenală; BM: măduvă osoasă; cartilaj; colorect: colon și rect; esoph: esofag; ochi; gallb: vezică biliară; rinichi; LN: ganglion limfatic; nerv; panc: pancreas; pituit: hipofiză; sal. gland: glandă salivară; skel.mus: mușchi scheletic; piele; sm.int: intestin subțire; splină; stomac; tiroidă; trahee; vezică urinară; glandă mamară; ovar; placentă; prostată; testicul; timus; uter. Eșantioane tumorale: AML: leucemie mieloidă acută; PCA: cancer de prostată; BRCA: cancer de glandă mamară; CLL: leucemie limfocitară cronică; CRC: cancer colorectal; GALB: cancer de vezică biliară; HCC: carcinom hepatocelular; MEL: melanom; NHL: limfom non-Hodgkin; OC: cancer ovarian; OSCAR: cancer esofagian; PC: cancer pancreatic; GB: glioblastom; GC: cancer gastric; NSCLC: cancer pulmonar non-microcelular; RCC: carcinom cu celule renale; SCLC: cancer pulmonar microcelular; UBC: carcinom de vezică urinară; UEC: cancer uterin și endometrial.

Figurile 6A – M prezintă exemple de rezultate ale răspunsurilor *in vitro* ale celulelor T CD8+ specifice peptidelor de la un donator sănătos de HLA-A*02+. Celulele T CD8+ au fost amorsate folosind APC-uri artificiale acoperite cu mAb anti-CD28 și HLA-A*02 în complex cu, de exemplu, peptida SEQ ID NO: 11 (A, panoul din stânga) sau peptida SEQ ID NO: 14 (B, panoul din stânga), respectiv [SEQ ID NO: 157 (C), 233 (D), 85 (E), 89 (F), 155 (G), 153 (H), 264 (I), 117 (J), 253 (K), 39 (L) și 203 (M)]. După trei cicluri de stimulare, detectarea celulelor reactive la peptide a fost efectuată prin colorarea multimerului 2D cu multimerul relevant, de exemplu A*02/SEQ ID NO: 11 (A) sau A*02/SEQ ID NO: 14 (B). Panourile din dreapta (de exemplu, A și B) arată colorarea de control a celulelor stimulate cu complexe A*02/peptidă irelevante. Celulele singlet viabile au fost selectate pentru limfocite CD8+. Porțile booleene au ajutat la excluderea evenimentelor fals-pozitive detectate cu mulțimi specifice pentru peptide diferite. Sunt indicate frecvențele de celule multimer+ specifice în rândul limfocitelor CD8+.

Figurile 7A – C arată suprareprezentarea diferitelor peptide în diferite țesuturi canceroase în comparație cu țesuturile normale. Analizele au inclus date din peste 320 de eșantioane de țesut normal și 462 de eșantioane de cancer. Sunt prezentate doar eșantioanele în care s-a constatat prezența peptidei. Figura 7A) Genă: CCR8, Peptidă: LLIPFTIFM (SEQ ID NO.: 43), Țesuturi (de la stânga la dreapta): 16 țesuturi canceroase (1 cancer de canal biliar, 1 cancer de glandă mamară, 1 cancer de colon, 7 cancere pulmonare, 2 cancere de ganglioni limfatici, 3 cancere ovariene, 1 cancer de piele); Figura 7B) Genă: CXCR5, Peptidă: ILVTSIFFL (SEQ ID NO.: 152), Țesuturi (de la stânga la dreapta): 6 țesuturi normale (1 ganglion limfatic, 5 splină), 16 țesuturi canceroase (8 cancere de leucemie leucocitară, 8 cancere de ganglioni limfatici); Figura 7C) Genă: CYSLTR1, Peptidă: VILTSSPFL (SEQ ID NO.: 156), Țesuturi (de la stânga la dreapta): 3 țesuturi normale (1 plămân, 1 ganglion limfatic, 1 splină), 11 țesuturi canceroase (2 cancere de glandă mamară, 5 cancere de leucemie leucocitară, 3 cancere de ganglioni limfatici, 1 cancer de celule mieloidale).

EXAMPLE

EXEMPLUL 1

Identificarea și cuantificarea peptidelor asociate tumorii prezentate pe suprafața celulei

Eșantioanele de țesut

Țesuturile tumorale ale pacienților au fost obținute de la Asterand (Detroit, SUA și Royston, Herts, Regatul Unit); Spitalul Universitar Val d'Hebron (Barcelona); BioServe (Beltsville, MD, SUA); Centrul pentru terapia imunitară a cancerului (CCIT), Spitalul Herlev (Herlev); Geneticist Inc. (Glendale, CA, SUA); Spitalul Universitar din Geneva; Spitalul Universitar din Heidelberg; Spitalul Universitar din Munchen; Universitatea de Medicină din prefectura Kyoto (KPUM); Universitatea din Osaka (OCU); ProteoGenex Inc., (Culver City, CA, SUA); Spitalul Universitar din Tübingen. Țesuturile normale au fost obținute de la Bio-Options Inc., CA, SUA; BioServe, Beltsville, MD, SUA; Capital BioScience Inc., Rockville, MD, SUA; Geneticist Inc., Glendale, CA, SUA; Spitalul Universitar din Geneva; Spitalul Universitar din Heidelberg; Spitalul Universitar din München; ProteoGenex Inc., Culver City, CA, SUA; Spitalul Universitar din Tübingen. Toți pacienții și-au dat consimțământul în cunoștință de cauză în scris înainte de intervenția chirurgicală sau autopsie. Țesuturile au fost congelate brusc imediat după excizie și au fost păstrate până la izolarea TUMAP-urilor la -70°C sau mai jos.

Izolarea peptidelor HLA din eșantioane de țesut

Seturile de peptide HLA din eșantioanele de țesut congelate rapid au fost obținute prin precipitare imunitară din țesuturi solide, în conformitate cu un protocol ușor modificat (Falk et al., 1991; Seeger et al., 1999), utilizând anticorpii specifici HLA-A*02 BB7.2, anticorpii specifici HLA-A, -B, -C-W6/32, sefaroză activată cu CNBr, tratament cu acid și ultrafiltrare.

Analizele prin spectrometrie de masă

Seturile de peptide HLA obținute au fost separate după hidrofobie prin cromatografie în fază inversă (sistem nanoAcquity UPLC, Waters), iar peptidele eluate au fost analizate într-un spectrometru de masă hibrid LTQ-velos și de fuziune (ThermoElectron) echipate cu o sursă ESI. Seturile de peptide au fost încărcate direct în coloana de analiză microcapilară cu siliciu infuzat (75 μm i.d. x 250 mm) prevăzută cu material în fază inversă C18, de 1,7 μm (Waters) cu aplicarea unui debit de 400 nL pe minut. Apoi, peptidele au fost separate cu ajutorul unui gradient binar de 180 minute în două trepte, de la 10% la 33% B, la un debit de 300 nL pe minut. Gradientul a fost compus din solvent A (0,1% acid formic în apă) și solvent B (0,1% acid formic în acetonitril). Pentru introducerea în sursa nanoESI s-a utilizat un capilar de sticlă acoperit cu aur (PicoTip, New Objective). Spectrometrele de masă LTQ-Orbitrap au fost operate în modul dependent de masă folosindu-se o strategie TOP5. Pe scurt, un ciclu de scanare a fost inițiat cu o scanare completă de mare precizie masică în Orbitrap (R = 30 000), urmată de scanări MS/MS tot în Orbitrap (R = 7500) pe cei mai abundenți 5 ioni precursori cu excluderea dinamică a ionilor selectați anterior. Spectrul de masă tandem a fost interpretat de SEQUEST și alte controale manuale. Secvența peptidică identificată a fost asigurată prin compararea modelului de fragmentare a peptidelor naturale generat cu modelul de fragmentare a peptidei sintetice de referință, cu secvență identică.

Cuantificarea relativă LC-MS fără marcarea a fost realizată prin numărarea ionilor, adică prin extragerea și analiza caracteristicilor LC-MS (Mueller et al., 2007). Metoda presupune că zona de semnal LC-MS a peptidei este corelată cu abundența acesteia în eșantion. Caracteristicile extrase au fost prelucrate ulterior prin deconvoluția stării de sarcină și alinierea timpului de retenție (Mueller et al., 2008; Sturm et al., 2008). În final, toate caracteristicile LC-MS au fost comparate cu rezultatele identificării secvenței pentru a combina datele cantitative din diferite eșantioane și țesuturi cu profilurile de prezentare a peptidelor. Datele cantitative au fost normalizate pe două niveluri, în funcție de tendința centrală, pentru a lua în considerare variația în cadrul replicilor tehnice și biologice. Astfel, fiecare peptidă identificată poate fi asociată cu date cantitative care permit o cuantificare relativă între eșantioane și țesuturi. În plus, toate datele cantitative obținute pentru peptidele candidate au fost inspectate manual pentru a asigura coerența datelor și pentru a verifica acuratețea analizei automate. Pentru fiecare peptidă a fost calculat un profil de prezentare care indică prezentarea medie a eșantionului, precum și variațiile din replici. Profilurile juxtapun eșantioanele de cancer pe o bază de referință de eșantioane de țesut normal. Exemple de profiluri de prezentare ale peptidelor supraprezentate sunt arătate în Figura 1. O imagine de ansamblu a prezentării peptidelor între entități este arătată în Tabelul 4 pentru anumite peptide.

Tabelul 4: Imagine de ansamblu a prezentării peptidelor selectate în cadrul entităților. Peptida a fost considerată interesantă pentru o entitate în cazul în care a fost supraprezentată pe eșantioane de cancer ale acestei entități în comparație cu țesuturile normale. MEL = melanom, BRCA = cancer de glandă mamară, OSCAR = carcinom esofagian. BPH include hiperplazia benignă de prostată, precum și cancerul pancreatic.

SEQ ID No.	Secvență	Entități de interes special
25	LLWGHPRVALA	CRC, PC, NSCLC

EXEMPLUL 2

Profilul de exprimare a genelor care codifică peptidele din descriere

Supraprezentarea sau prezentarea specifică a unei peptide pe celulele tumorale în comparație cu celulele normale este suficientă pentru ca aceasta să fie utilă în imunoterapie, iar unele peptide sunt specifice tumorilor în pofida faptului că proteina lor sursă se găsește și în țesuturi normale. Cu toate acestea, profilarea exprimării ARNm-ului adaugă un nivel suplimentar de siguranță în selectarea țintelor peptidice pentru imunoterapii. În special pentru opțiunile terapeutice cu riscuri ridicate de siguranță, cum ar fi TCR-urile maturate prin afinitate, peptida-țintă ideală va fi derivată dintr-o proteină care este unică pentru tumoare și care nu se găsește în țesuturile normale. Pentru această descriere, s-a demonstrat că exprimarea în țesutul normal a tuturor genelor-sursă este minimă, pe baza bazei de date descrise mai sus de date de exprimare a ARN-ului care acoperă aproximativ 3.000 de eșantioane de țesut normal. În cazul unor entități canceroase (HCC, CRC, GB, GC, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA), au fost adăugate analize suplimentare ale ARN-ului din țesuturi normale și tumorale pentru a se estima acoperirea-țintă în populația de pacienți care suferă de cancerul respectiv.

Sursele de ARN și pregătirea lor

Eșantioanele de țesut prelevate chirurgical au fost furnizate conform indicațiilor de mai sus (a se vedea Exemplul 1), după ce s-a obținut consimțământul în cunoștință de cauză în scris de la fiecare pacient. Eșantioanele de țesut tumoral au fost congelate imediat după intervenția chirurgicală și apoi omogenizate cu mortar și pistil în azot lichid. ARN-ul total a fost preparat din aceste eșantioane cu ajutorul reactivului TRI (Ambion, Darmstadt, Germania), urmat de o curățare cu RNeasy (QIAGEN, Hilden, Germania); ambele metode au fost efectuate în conformitate cu protocolul producătorului.

ARN-ul total din țesuturi umane sănătoase a fost obținut comercial (Ambion, Huntingdon, Anglia; Clontech, Heidelberg, Germania; Stratagene, Amsterdam, Olanda; BioChain, Hayward, CA, SUA). ARN-ul de la mai mulți indivizi (între 2 și 123 indivizi) a fost combinat astfel încât ARN-ul fiecărui individ să fie ponderat în mod egal. Calitatea și cantitatea tuturor probelor de ARN au fost evaluate pe un bioanalizator Agilent 2100 (Agilent, Waldbronn, Germania) folosind trusa RNA 6000 Pico LabChip (Agilent).

ARN-ul total din țesuturile umane sănătoase pentru experimentele RNASeq a fost obținut de la: Asterand (Detroit, MI, SUA și Royston, Herts, Regatul Unit), BioCat GmbH (Heidelberg, Germania), BioServe (Beltsville, MD, SUA), Capital BioScience Inc. (Rockville, MD, SUA), Geneticist Inc. (Glendale, CA, SUA), Istituto Nazionale Tumori „Pascale” (Napoli, Italia), ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, SUA), Spitalul Universitar din Heidelberg (Heidelberg, Germania).

ARN-ul total din țesuturile tumorale pentru experimentele RNASeq a fost obținut de la: Asterand (Detroit, MI, SUA și Royston, Herts, Regatul Unit), Bio-Options Inc. (Brea, CA, SUA), BioServe (Beltsville, MD, SUA), Geneticist Inc. (Glendale, CA, SUA), ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, SUA), Tissue Solutions Ltd (Glasgow, Regatul Unit), Spitalul Universitar din Bonn (Bonn, Germania), Spitalul Universitar din Heidelberg (Heidelberg, Germania), Spitalul Universitar din Tübingen (Tübingen, Germania).

Experimente în micromatrice

Acoperirea a fost estimată prin analiza profilurilor de exprimare a ARN-ului (micromatrice Affymetrix) din 30 GB-uri, 16 CRC-uri, 56 RCC-uri, 12 HCC-uri, 38 NSCLC-uri, 11 PC-uri, 34 GC-uri și 20 de eșantioane de cancer de prostată.

Analiza exprimării genomului tuturor eșantioanelor de ARN din țesut tumoral și normal a fost efectuată cu micromatrice de oligonucleotide Affymetrix Human Genome (HG) U133A sau HG-U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, SUA). Toate etapele au fost efectuate în conformitate cu manualul Affymetrix. Pe scurt, ADNc-ul cu dublu-helix a fost sintetizat din 5–8 μg de ARN total, folosindu-se SuperScript RTII (Invitrogen) și amorsa oligo-dT-T7 (MWG Biotech, Ebersberg, Germania) conform descrierii din manual. Transcripția *in vitro* a fost efectuată cu o trusă BioArray High Yield RNA Transcript Labelling (ENZO Diagnostics, Inc., Farmingdale, NY, SUA) pentru matricele U133A sau cu o trusă GeneChip IVT Labelling (Affymetrix) pentru matricele U133 Plus 2.0, urmată de fragmentarea ARNc-ului, hibridizare și colorare cu streptavidină-ficoeritrină și anticorp antistreptavidină biotinitat (Molecular Probes, Leiden, Olanda). Imaginile au fost scanate cu Agilent 2500A GeneArray Scanner (U133A) sau cu Affymetrix Gene-Chip Scanner 3000 (U133 Plus 2.0), iar datele au fost analizate cu software-ul GCOS (Affymetrix), folosindu-se setările implicite pentru toți parametrii. Pentru normalizare au fost folosite 100 de gene auxiliare furnizate de Affymetrix. Valorile exprimărilor relative au fost calculate pe baza rapoartelor jurnalelor de semnale furnizate de software, iar eșantionul normal a fost stabilit arbitrar la 1,0. În Figura 2 sunt prezentate exemple de profiluri de exprimare ale genelor-sursă ale prezentei descrieri care sunt puternic supraexprimate sau exclusiv exprimate în HCC, CRC, GB, GC,

NSCLC, PC, RCC sau BPH/PCA. O imagine de ansamblu a acoperirii pentru genele selectate este prezentată în Eroare! Sursa de referință nu a fost găsită.

Experimentele cu RNAseq

Analiza exprimării genice a eșantioanelor de ARN din tumori și din țesut normal a fost efectuată prin secvențiere de generația următoare (RNAseq) de către CeGaT (Tübingen, Germania). Pe scurt, bibliotecile de secvențiere sunt pregătite folosind trusa de reactivi Illumina HiSeq v4 în conformitate cu protocolul furnizorului (Illumina Inc., San Diego, CA, SUA), care include fragmentarea ARN-ului, conversia ADNc-ului și adăugarea de adaptoare de secvențiere. Bibliotecile derivate din mai multe eșantioane sunt amestecate echimolar și secvențiate pe secvențiator Illumina HiSeq 2500 în conformitate cu instrucțiunile producătorului, generând citiri single-end de 50 bp. Citirile procesate sunt cartografiate la genomul uman (GRCh38) folosind programul STAR. Datele de exprimare sunt furnizate la nivel de transcripție ca RPKM (citiri per kilobază per milion de citiri cartografiate, generate de software-ul Cufflinks) și la nivel de exon (citiri totale, generate de software-ul Bedtools), pe baza adnotărilor din baza de date de secvențe Ensembl (Ensembl77). Citirile de exoni sunt normalizate în funcție de lungimea exonului și de dimensiunea alinierii pentru a obține valorile RPKM.

Exemple de profiluri de exprimare ale genelor-sursă ale prezentei descrieri care sunt puternic supraexprimate sau exclusiv exprimate în NHL, BRCA, GBC, CCC, MEL, OC, OSCAR, SCLC, UBC, UEC sunt prezentate în Figurile 2 F–H.

EXEMPLUL 3

Imunogenitatea *in vitro* a peptidelor prezentate de MHC de clasă I

Pentru a obține informații cu privire la imunogenitatea TUMAP-urilor din prezenta descriere, inventatorii au efectuat cercetări folosind un test de inițiere a celulelor T *in vitro* bazat pe stimulări repetate ale celulelor T CD8+ cu celule prezentatoare de antigen artificiale (aAPCs) încărcate cu complexe peptidă-MHC și anticorpi anti-CD28. În acest fel, inventatorii au putut demonstra imunogenitatea pentru 47 de TUMAP-uri restricționate HLA-A*0201 din cele descrise până în prezent, demonstrând că aceste peptide sunt epitopi ai celulelor T împotriva cărora există celule T precursorale CD8+ la om (Eroare! Sursa de referință nu a fost găsită.6A și B).

Amorsarea *in vitro* a celulelor T CD8+

Pentru a efectua stimulări *in vitro* cu celule prezentatoare de antigen artificiale încărcate cu complex peptidă-MHC (pMHC) și anticorp anti-CD28, inventatorii au izolat mai întâi celule T CD8+ din celule HLA-A*02 proaspete produse de leucafereză prin selecție pozitivă folosind microsfele CD8 (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germania) de la donatori sănătoși obținute de la Clinicile Universitare din Mannheim, Germania, după obținerea consimțământului în cunoștință de cauză. PBMC-urile și limfocitele CD8+ izolate au fost incubate în mediu de celule T (TCM) până la utilizare, constând în RPMI-Glutamax (Invitrogen, Karlsruhe, Germania) suplimentat cu 10% ser AB uman inactivat termic (PAN-Biotech, Aidenbach, Germania), 100 U/ml Penicilină/100 μg/ml Streptomicină (Cambrex, Köln, Germania), 1 mM piruvat de sodiu (CC Pro, Oberdorla, Germania), 20 μg/ml Gentamicină (Cambrex). În această etapă, în TCM s-au adăugat, de asemenea, 2,5 ng/ml de IL-7 (PromoCell, Heidelberg, Germania) și 10 U/ml de IL-2 (Novartis Pharma, Nürnberg, Germania). Generarea granulelor acoperite cu pMHC/anti-CD28 și stimularea și citirea celulelor T a fost realizată într-un sistem *in vitro* foarte bine definit, utilizând patru molecule pMHC diferite pentru fiecare condiție de stimulare și 8 molecule pMHC diferite pentru fiecare condiție de citire.

IgG2a antistimulator de soarece purificat de co-stimulare CD28 uman Ab 9.3 (Jung et al., 1987) a fost biotinitat chimic folosind sulfo-N-hidroxisuccinimidobiotină, conform recomandărilor producătorului (Perbio, Bonn, Germania). Microsferele utilizate au fost particule de polistiren cu diametrul de 5,6 μm acoperite cu streptavidină (Bangs Laboratories, Illinois, SUA).

pMHC-urile utilizate pentru stimulările de control pozitiv și negativ au fost A*0201/MLA-001 (peptida ELAGIGILTV (SEQ ID NO: 289) din Melan-A/MART-1 modificat) și, respectiv, A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI din DDX5, SEQ ID NO: 290).

800.000 de microsfele/200 μl au fost acoperite în plăci cu 96 de godeuri în prezența a 4 x 12,5 ng de biotină-pMHC diferite, spălate și ulterior au fost adăugate 600 ng de biotină anti-CD28 într-un volum de 200 μl. Stimulările au fost inițiate în plăci cu 96 de godeuri prin co-incubarea a 1x10⁶ celule T CD8+ cu 2x10⁵ microsfele acoperite spălate în 200 μl de TCM suplimentat cu 5 ng/ml de IL-12 (PromoCell) timp de 3 zile la 37°C. Jumătate din mediu a fost apoi schimbat cu TCM proaspăt suplimentat cu 80 U/ml de IL-2 și incubarea a continuat timp de 4 zile la 37°C. Acest ciclu de stimulare a fost efectuat, în total, de trei ori. Pentru citirea multimerului pMHC folosind 8 molecule pMHC diferite per condiție, a fost utilizată o abordare de codificare combinatorie bidimensională, așa cum a fost descrisă anterior (Andersen et al., 2012), cu modificări minore care includ cuplarea la 5 fluorocromi diferiți. În cele din urmă, s-au efectuat analize multimerice prin colorarea celulelor cu colorant Live/dead near IR

(Invitrogen, Karlsruhe, Germania), anticorp CD8-FITC clona SK1 (BD, Heidelberg, Germania) și multimeri pMHC fluorescenți. Pentru analiză, s-a folosit un citometru BD LSRII SORP echipat cu lasere și filtre adecvate. Celulele specifice peptidelor au fost calculate ca procentaj din totalul celulelor CD8+. Evaluarea analizei multimerice a fost realizată cu ajutorul software-ului FlowJo (Tree Star, Oregon, SUA). Amorsarea *in vitro* a limfocitelor CD8+ multimer+ specifice a fost detectată prin comparație cu stimulările de control negativ. Imunogenitatea pentru un anumit antigen a fost detectată în cazul în care s-a constatat că cel puțin un godeu evaluabil stimulat *in vitro* de la un donator sănătos conținea o linie specifică de celule T CD8+ după stimularea *in vitro* (adică acest godeu conținea cel puțin 1% celule T CD8+ multimer+ specifice, iar procentajul de celule multimer+ specifice era de cel puțin 10 ori mai mare decât mediana stimulărilor de control negativ).

Imunogenitatea *in vitro* a peptidelor

În cazul peptidelor HLA de clasă I testate, imunogenitatea *in vitro* a putut fi demonstrată prin generarea de linii de celule T specifice peptidelor. Exemple de rezultate ale citometriei în flux după colorarea multimerului specific TUMAP pentru 15 peptide ale descrieri sunt prezentate în Figurile 3 și 6, împreună cu controalele negative corespunzătoare.

EXEMPLUL 4

Sintetizarea peptidelor

Toate peptidele au fost sintetizate cu ajutorul sintezei standard și bine stabilite a peptidelor în fază solidă, folosind strategia Fmoc.

Identitatea și puritatea fiecărei peptide individuale au fost determinate prin spectrometrie de masă și RP-HPLC analitică. Peptidele au fost obținute sub formă de liofilizate (sare de trifluoroacetat) de culoare albă până la albă-deschis, cu o puritate de >50%.

Toate TUMAP-urile se administrează de preferință sub formă de săruri de trifluoroacetat sau de acetat, dar sunt posibile și alte forme de sare.

EXEMPLUL 5

Testele de legare a MHC-urilor

Peptidele candidate pentru terapiile pe bază de celule T conform prezentei descrieri au fost testate în continuare pentru capacitatea lor de legare la MHC (afinitate). Complexele peptidă-MHC individuale au fost produse prin schimb de liganzi UV, în care o peptidă sensibilă la UV este scindată prin iradiere UV și schimbată cu peptida de interes, așa cum a fost analizată. Numai peptidele candidate care se pot lega și pot stabiliza eficient moleculele MHC receptiive la peptide împiedică disocierea complexelor MHC. Pentru a determina randamentul reacției de schimb, s-a efectuat un test ELISA bazat pe detectarea lanțului ușor ($\beta 2m$) al complexelor MHC stabilizate. Testul a fost efectuat conform descrierii generale din Rodenko et al. (Rodenko et al., 2006).

Plăcile MAXISorp cu 96 de godeuri (NUNC) au fost acoperite peste noapte cu 2 μ g/ml de streptavidină în PBS la temperatura camerei, spălate de 4 ori și blocate timp de 1 oră la 37°C în soluție-tampon de blocare cu 2% BSA. Monomerii HLA-A*02:01/MLA-001 repliați au servit drept standarde, acoperind intervalul 15–500 ng/ml. Monomerii peptidă-MHC din reacția de schimb UV au fost diluați de 100 de ori în soluție-tampon de blocare. Eșantioanele au fost incubate timp de o oră la 37°C, spălate de patru ori, incubate cu 2 μ g/ml de anti- $\beta 2m$ conjugat cu HRP timp de o oră la 37°C, spălate din nou și detectate cu soluție de TMB care este oprită cu NH₂SO₄. Absorbția a fost măsurată la 450 nm. Peptidele candidate care prezintă un randament de schimb ridicat (preferabil mai mare de 50%, cel mai preferabil de 75%) sunt în general preferate pentru generarea și producerea de anticorpi sau de fragmente ale acestora și/sau de receptori de celule T sau de fragmente ale acestora, deoarece prezintă suficientă aviditate față de moleculele MHC și împiedică disocierea complexelor MHC.

Tabelul 5: Scoruri de legare la MHC de clasă I.

Legarea peptidei restricționate de HLA de clasă I la HLA-A*02:01 a fost evaluată prin randamentul schimbului de peptide: $\geq 10\%$ = +; $\geq 20\%$ = ++; $\geq 50\%$ = +++; $\geq 75\%$ = ++++

SEQ ID	Secvență	Schimb de peptide
25	LLWGHPRVALA	+++

EXEMPLUL 6

Tabelul 6: Peptidă preferată în conformitate cu prezenta invenție

SEQ ID No	Secvență	Cod peptidă
25	LLWGHPRVALA	MXRA5-003

Cuantificarea absolută a peptidelor asociate tumorii prezentate pe suprafața celulei

Generarea de lianți, cum ar fi anticorpii și/sau TCR-urile, este un proces laborios, care poate fi efectuat numai pentru un număr de ținte selectate. În cazul peptidelor asociate și specifice tumorilor, criteriile de selecție includ, dar nu se limitează la exclusivitatea prezentării și la densitatea peptidei prezentate pe suprafața celulară. În plus față de izolarea și cuantificarea relativă a peptidelor, așa cum este descrisă în prezentul document, inventatorii au analizat copiile absolute de peptide per celulă, așa cum este descris. Cuantificarea numărului de copii de TUMAP-uri per celulă în eșantioanele de tumori solide necesită cuantificarea absolută a TUMAP-urilor izolate, eficacitatea izolării TUMAP-urilor și numărul de celule din eșantionul de țesut analizat.

Cuantificarea peptidelor prin nanoLC-MS/MS

Pentru o cuantificare precisă a peptidelor prin spectrometrie de masă, a fost generată o curbă de calibrare pentru fiecare peptidă folosind metoda standardului intern. Standardul intern este o variantă marcată cu doi izotopi a fiecărei peptide, adică în sinteza TUMAP-urilor au fost incluși doi aminoacizi marcați cu izotopi. Acesta diferă de peptida asociată tumorii doar prin masa sa, dar nu prezintă nicio diferență în ceea ce privește alte proprietăți fizico-chimice (Anderson et al., 2012). Standardul intern a fost adăugat la fiecare probă MS și toate semnalele MS au fost normalizate la semnalul MS al standardului intern pentru a elimina eventualele variații tehnice între experimentele MS.

Curbele de calibrare au fost pregătite în cel puțin trei matrice diferite, și anume eluați de peptide HLA din eșantioane naturale similare cu probele MS de rutină, iar fiecare preparat a fost măsurat în ruli MS duplicate. Pentru evaluare, semnalele MS au fost normalizate în raport cu semnalul standardului intern și s-a calculat o curbă de calibrare prin regresie logistică.

Pentru cuantificarea peptidelor asociate tumorilor din eșantioanele de țesut, eșantioanele respective au fost, de asemenea, adăugate cu standardul intern; semnalele MS au fost normalizate în raport cu standardul intern și cuantificate cu ajutorul curbei de calibrare a peptidelor.

Eficacitatea izolării complexelor peptidă-MHC

Ca în cazul oricărui proces de purificare a proteinelor, izolarea proteinelor din eșantioane de țesut este asociată cu o anumită pierdere a proteinei de interes. Pentru a determina eficiența izolării TUMAP-urilor, au fost generate complexe peptidă-MHC pentru toate TUMAP-urile selectate pentru cuantificare absolută. Pentru a putea discrimina complexe peptidă-MHC adăugate de cele naturale, s-au utilizat versiuni ale TUMAP-urilor marcate cu un singur izotop, adică în sinteza TUMAP-urilor a fost inclus un aminoacid marcat cu un izotop. Aceste complexe au fost adăugate în lizații tisulare proaspăt preparate, adică în cel mai timpuriu punct posibil al procedurii de izolare a TUMAP-urilor, și apoi au fost capturate la fel ca și complexe peptidă-MHC naturale în următoarea purificare de afinitate. Prin urmare, măsurarea recuperării TUMAP-urilor cu un singur marcaj permite formularea de concluzii privind eficiența izolării TUMAP-urilor naturale individuale.

Eficacitatea izolării a fost analizată pe un număr redus de eșantioane și a fost comparabilă între aceste eșantioane de țesut. În schimb, eficacitatea izolării diferă între peptidele individuale. Acest lucru sugerează că eficacitatea izolării, deși determinată doar pe un număr limitat de eșantioane de țesut, poate fi extrapolată la orice alt preparat tisular. Cu toate acestea, este necesar să se analizeze fiecare TUMAP în parte, deoarece eficacitatea izolării nu poate fi extrapolată de la o peptidă la altele.

Determinarea numărului de celule în țesuturi solide, congelate

Pentru a determina numărul de celule din eșantioanele de țesut supuse cuantificării absolute a peptidelor, inventatorii au aplicat analiza conținutului de ADN. Această metodă este aplicabilă unei game largi de eșantioane de diferite origini și, cel mai important, eșantioanelor congelate (Alcoser et al., 2011; Forsey și Chaudhuri, 2009; Silva et al., 2013). În timpul protocolului de izolare a peptidelor, un eșantion de țesut este procesat pentru a obține un lizat omogen, din care se prelevează o parte alicotă mică de lizat. Partea alicotă este împărțită în trei părți, din care se izolează ADN-ul (QiaAmp DNA Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germania). Conținutul total de ADN din fiecare izolare de ADN este cuantificat cu ajutorul unui test de cuantificare a ADN-ului bazat pe fluorescență (Qubit dsDNA HS Assay Kit, Life Technologies, Darmstadt, Germania) în cel puțin două replicări.

Pentru a calcula numărul de celule, a fost generată o curbă standard de ADN din părți alicote de celule sanguine sănătoase singulare, cu o gamă de numere de celule definite. Curba standard este utilizată pentru a calcula conținutul total de celule din conținutul total de ADN din fiecare izolare de ADN. Numărul total mediu de celule din eșantionul de țesut utilizat pentru izolarea peptidelor este extrapolat având în vedere volumul cunoscut al părților alicote de lizat și volumul total al lizatului.

Copii de peptide per celulă

Folosind datele din experimentele menționate mai sus, inventatorii au calculat numărul de copii ale TUMAP-urilor per celulă prin împărțirea cantității totale de peptide la numărul total de celule din eșantion, urmată de împărțirea prin eficacitatea izolării.

Listă de referințe

- Adelaide, J. et al., *Cancer Res* 67 (2007): 11565-11575
- Alcoser, S. Y. et al., *BMC.Biotechnol.* 11 (2011): 124
- Allison, J. P. et al., *Science* 270 (1995): 932-933
- 5 American Cancer Society, (2015), www.cancer.org
- Ampie, L. et al., *Front Oncol.* 5 (2015): 12
- Andersen, R. S. et al., *Nat.Protoc.* 7 (2012): 891-902
- Anderson, N. L. et al., *J Proteome.Res* 11 (2012): 1868-1878
- Appay, V. et al., *Eur.J Immunol.* 36 (2006): 1805-1814
- 10 Arafat, H. et al., *Surgery* 150 (2011): 306-315
- Aung, P. P. et al., *Oncogene* 25 (2006): 2546-2557
- Avigan, D. et al., *Clin Cancer Res.* 10 (2004): 4699-4708
- Baba, T. et al., *Eur.J Cardiothorac.Surg.* 43 (2013): 759-764
- Bahnassy, A. A. et al., *World J Gastroenterol.* 20 (2014): 18240-18248
- 15 Banchemereau, J. et al., *Cell* 106 (2001): 271-274
- Band, A. M. et al., *J Mammary.Gland.Biol Neoplasia.* 16 (2011): 109-115
- Bankovic, J. et al., *Lung Cancer* 67 (2010): 151-159
- Beatty, G. et al., *J Immunol* 166 (2001): 2276-2282
- Beaty, T. H. et al., *Hum.Genet.* 132 (2013): 771-781
- 20 Beggs, J. D., *Nature* 275 (1978): 104-109
- Bell, J. L. et al., *J Clin Oncol* 33 (2015): 1285-1293
- Bell, J. L. et al., *Cell Mol Life Sci.* 70 (2013): 2657-2675
- Benjamini, Y. et al., *Journal of the Royal Statistical Society.Series B (Methodological)*, 57 (1995): 289-300
- 25 Berger, C. et al., *Curr.Mol.Med.* 13 (2013): 1229-1240
- Berman, R. S. et al., National Cancer Institute: PDQ(R) Colon Cancer Treatment (2015a)
- Berman, R. S. et al., National Cancer Institute: PDQ(R) Rectal Cancer Treatment (2015b) Bhan, S. et al., *Oncol Rep.* 28 (2012): 1498-1502
- Bode, P. K. et al., *Mod.Pathol.* 27 (2014): 899-905
- 30 Bogush, T. A. et al., *Antibiot.Khimioter.* 54 (2009): 41-49
- Bonventre, J. V., *Trans.Am.Clin Climatol.Assoc.* 125 (2014): 293-299
- Boulter, J. M. et al., *Protein Eng* 16 (2003): 707-711
- Braummüller, H. et al., *Nature* (2013)
- Bray, F. et al., *Int J Cancer* 132 (2013): 1133-1145
- 35 Brossart, P. et al., *Blood* 90 (1997): 1594-1599
- Bruckdorfer, T. et al., *Curr.Pharm.Biotechnol.* 5 (2004): 29-43
- Butterfield, L. H. et al., *Clin Cancer Res* 12 (2006): 2817-2825
- Butterfield, L. H. et al., *Clin Cancer Res* 9 (2003): 5902-5908
- Caballero, O. L. et al., *PLoS.One.* 5 (2010)
- 40 Carballido, E. et al., *Cancer Control* 19 (2012): 54-67
- Card, K. F. et al., *Cancer Immunol Immunother.* 53 (2004): 345-357
- Chang, Y. S. et al., *Cancer Chemother.Pharmacol.* 59 (2007): 561-574
- Chanock, S. J. et al., *Hum.Immunol.* 65 (2004): 1211-1223
- Chapiro, J. et al., *Radiol.Med.* 119 (2014): 476-482
- 45 Chen, H. S. et al., *Zhonghua Gan Zang.Bing.Za Zhi.* 11 (2003): 145-148
- Chen, S. T. et al., *Cancer Sci.* 102 (2011b): 2191-2198
- Chen, Y. L. et al., *Int J Surg.* 11 (2013c): 85-91
- Chen, Y. T. et al., *Cancer Immun.* 5 (2005): 9
- Cierna, Z. et al., *BMC.Cancer* 14 (2014): 472
- 50 Ciruelos Gil, E. M., *Cancer Treat.Rev* 40 (2014): 862-871
- Cohen, C. J. et al., *J Mol Recognit.* 16 (2003a): 324-332
- Cohen, C. J. et al., *J Immunol* 170 (2003b): 4349-4361
- Cohen, S. N. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 69 (1972): 2110-2114
- Coligan, J. E. et al., *Current Protocols in Protein Science* (1995)
- 55 Colombetti, S. et al., *J Immunol.* 176 (2006): 2730-2738
- Coosemans, A. et al., *Anticancer Res* 33 (2013): 5495-5500
- Coulie, P. G. et al., *Immunol.Rev* 188 (2002): 33-42
- Counter, C. M. et al., *Blood* 85 (1995): 2315-2320
- Cuadros, T. et al., *Cancer Res* 74 (2014): 1416-1428

- Cuadros, T. et al., *Eur.J Cancer* 49 (2013): 2034-2047
Dalerba, P. et al., *Int.J Cancer* 93 (2001): 85-90
De, Plaen E. et al., *Immunogenetics* 40 (1994): 360-369
Dengjel, J. et al., *Clin Cancer Res* 12 (2006): 4163-4170
5 Denkberg, G. et al., *J Immunol* 171 (2003): 2197-2207
Downie, D. et al., *Clin Cancer Res.* 11 (2005): 7369-7375
Du, X. et al., *Clin Cancer Res* 20 (2014): 6324-6335
Duan, Z. et al., *Clin Cancer Res* 9 (2003): 2778-2785
Ek, S. et al., *Cancer Res* 62 (2002): 4398-4405
10 Emens, L. A., *Expert.Rev.AnticancerTher.* 12(2012): 1597-1611
Enguita-German, M. et al., *World J Hepatol.* 6 (2014): 716-737
Estey, E. H., *Am.J Hematol.* 89 (2014): 1063-1081
Falk, K. et al., *Nature* 351 (1991): 290-296
Ferlay et al., *GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC*
15 *CancerBase No. 11 [Internet], (2013), <http://globocan.iarc.fr>*
Findeis-Hosey, J. J. et al., *Biotech.Histochem.* 87 (2012): 24-29
Fong, L. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.il.S.A* 98 (2001): 8809-8814
Forsey, R. W. et al., *Biotechnol.Lett.* 31 (2009): 819-823
Frasor, J. et al., *Mol.Cell Endocrinol.* 418 Pt 3 (2015): 235-239
20 Fuge, O. et al., *Res Rep.Urol.* 7 (2015): 65-79
Fujiyama, T. et al., *J Dermatol.Sci.* 75 (2014): 43-48
Fukuyama, T. et al., *Cancer Res.* 66 (2006): 4922-4928
Fuqua, S. A. et al., *Breast Cancer Res Treat.* 144 (2014): 11-19
Gabrilovich, D. I. et al., *Nat Med.* 2 (1996): 1096-1103
25 Gandhi, A. V. et al., *Ann Surg.Oncol* 20 Suppl 3 (2013): S636-S643
Gardina, P. J. et al., *BMC.Genomics* 7 (2006): 325
Gattinoni, L. et al., *Nat Rev.Immunol* 6 (2006): 383-393
Giannopoulos, K. et al., *Leukemia* 24 (2010): 798-805
Giannopoulos, K. et al., *Int.J Oncol* 29 (2006): 95-103
30 Gibbs, P. et al., *Melanoma Res* 10 (2000): 259-264
Gnjatic, S. et al., *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100 (2003): 8862-8867
Godkin, A. et al., *Int.Immunol* 9 (1997): 905-911
Gong, Y. et al., *Adv.Anat.Pathol.* 21 (2014): 191-200
Grah, J. J. et al., *Tumori* 100 (2014): 60-68
35 Granziero, L. et al., *Blood* 97 (2001): 2777-2783
Green, M. R. et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* 4th (2012)
Greenfield, E. A., *Antibodies: A Laboratory Manual* 2nd (2014)
Gu, X. et al., *Sci.Rep.* 4 (2014): 6625
Gunawardana, C. et al., *Br.J Haematol.* 142 (2008): 606-609
40 Hall, R. D. et al., *Cancer Control* 20 (2013): 22-31
Hamilton, K. E. et al., *Mol.Cancer Res* 13 (2015): 1478-1486
Han, L. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* 7 (2014): 6734-6742
Hanagiri, T. et al., *Anticancer Res.* 33 (2013): 2123-2128
Harig, S. et al., *Blood* 98 (2001): 2999-3005
45 Hasegawa, H. et al., *Arch.Pathol.Lab Med.* 122 (1998): 551-554
Hayashi, S. I. et al., *Endocr.Relat Cancer* 10 (2003): 193-202
Hennard, C. et al., *J Pathol.* 209 (2006): 430-435
Herbert, N. et al., *J Immunol.* 185 (2010): 902-916
Hinrichs, C. S. et al., *Nat.Biotechnol.* 31 (2013): 999-1008
50 Hiramoto, T. et al., *Oncogene* 18 (1999): 3422-3426
Hoffmann, N. E. et al., *Cancer* 112 (2008): 1471-1479
Holtl, L. et al., *Clin.Cancer Res.* 8 (2002): 3369-3376
Hsu, H. C. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* 329 (2005): 1108-1117
Hu, S. et al., *J Cancer Res Clin Oncol* 140 (2014): 883-893
55 Huang, X. et al., *Cell Prolif.* 48 (2015b): 593-599
Hui, L. et al., *Oncol Rep.* 34 (2015): 2627-2635
Hussein, Y. M. et al., *Med.Oncol* 29 (2012): 3055-3062
Hwang, M. L. et al., *J Immunol.* 179 (2007): 5829-5838
Ioannidis, P. et al., *Anticancer Res* 23 (2003): 2179-2183

- Jeng, Y. M. et al., *Br.J Surg.* 96 (2009): 66-73
- Jung, G. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1987): 4611 -4615
- Kalos, M. et al., *Sci.Transl.Med.* 3(2011): 95ra73
- Kang, C. Y. et al., *J Gastrointest.Surg.* 18 (2014): 7-15
- 5 Kibbe, A. H., *Handbook of Pharmaceutical Excipients rd* (2000)
- Kim, Y. D. et al., *Int.J Mol.Med.* 29 (2012): 656-662
- Kobayashi, H. et al., *Oncol Lett.* 10 (2015): 612-618
- Koido, S. et al., *World J Gastroenterol.* 19 (2013): 8531-8542
- Krackhardt, A. M. et al., *Blood* 100 (2002): 2123-2131
- 10 Krieg, A. M., *Nat Rev.Drug Discov.* 5 (2006): 471-484
- Lederer, M. et al., *Semin.Cancer Biol* 29 (2014): 3-12
- Lee, M. Y. et al., *J Cell Physiol* 224 (2010): 17-27
- Lee, W. C. et al., *J Immunother.* 28 (2005): 496-504
- Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, 030/099, (2014)
- 15 Leivo, I. et al., *Cancer Genet.Cytogenet.* 156 (2005): 104-113
- Leonetti, M. D. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 109 (2012): 19274-19279
- Li, H. et al., *Bull.Cancer* 99 (2012): E26-E33
- Li, M. et al., *Clin Cancer Res* 11 (2005): 1809-1814
- Li, W. M. et al., *J Surg.Oncol* (2016)
- 20 Li, Y. et al., *Cancer Epidemiol.* 39 (2015): 8-13
- Liddy, N. et al., *Nat Med.* 18 (2012): 980-987
- Lin, J. et al., *Clin Cancer Res* 10 (2004): 5708-5716
- Lin, L. et al., *Oncol Lett.* 6 (2013): 740-744
- Lisitskaia, K. V. et al., *Mol.Gen.Mikrobiol.Virusol.* (2010): 34-37
- 25 Liu, X. et al., *Int.Immunopharmacol.* 25 (2015): 416-424
- Ljunggren, H. G. et al., *J Exp.Med.* 162 (1985): 1745-1759
- Llovet, J. M. et al., *N.Engl.J Med.* 359 (2008): 378-390
- Longenecker, B. M. et al., *Ann N.Y.Acad.Sci.* 690 (1993): 276-291
- Lonsdale, J., *Nat.Genet.* 45 (2013): 580-585
- 30 Lukas, T. J. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 78 (1981): 2791-2795
- Lundblad, R. L., *Chemical Reagents for Protein Modification 3rd* (2004)
- Luo, C. et al., *Clin Cancer Res* 13 (2007): 1288-1297
- Mantia-Smaldone, G. M. et al., *Hum.Vaccin.Immunother.* 8 (2012): 1179-1191
- Marten, A. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* 51 (2002): 637-644
- 35 Mason, J. M. et al., *Nucleic Acids Res.* 43 (2015): 3180-3196
- Massari, F. et al., *Cancer Treat.Rev.* 41 (2015): 114-121
- Matsueda, S. et al., *World J Gastroenterol.* 20 (2014): 1657-1666
- Maus, M. V. et al., *Blood* 123 (2014): 2625-2635
- Mayr, C. et al., *Exp.Hematol.* 34 (2006): 44-53
- 40 Mayr, C. et al., *Blood* 105 (2005): 1566-1573
- Mehta, A. et al., *Breast* 23 (2014): 2-9
- Meziere, C. et al., *J Immunol* 159 (1997): 3230-3237
- Miyagi, Y. et al., *Clin Cancer Res* 7 (2001): 3950-3962
- Miyoshi, Y. et al., *Med.Mol.Morphol.* 43 (2010): 193-196
- 45 Molina, J. R. et al., *Mayo Clin Proc.* 83 (2008): 584-594
- Mongan, N. P. et al., *Mol.Carcinog* 45 (2006): 887-900
- Morgan, R. A. et al., *Science* 314 (2006): 126-129
- Mori, M. et al., *Transplantation* 64 (1997): 1017-1027
- Mortara, L. et al., *Clin Cancer Res.* 12 (2006): 3435-3443
- 50 Moulton, H. M. et al., *Clin Cancer Res* 8 (2002): 2044-2051
- Mueller, L. N. et al., *J Proteome.Res* 7 (2008): 51-61
- Mueller, L. N. et al., *Proteomics.* 7 (2007): 3470-3480
- Mumberg, D. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96 (1999): 8633-8638
- Murray, G. I. et al., *Histopathology* 57 (2010): 202-211
- 55 National Cancer Institute, (5-6-2015), www.cancer.gov
- Noubissi, F. K. et al., *J Invest Dermatol.* 134 (2014): 1718-1724
- Oehrich, N. et al., *Int.J Cancer* 117 (2005): 256-264
- Okuno, K. et al., *Exp.Ther Med.* 2 (2011): 73-79
- Ottaviani, S. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* 55 (2006): 867-872

- Otte, M. et al., *Cancer Res* 61 (2001): 6682-6687
 Ozeki, N. et al., *Int.J Mol.Sci.* 17 (2016)
 Pai, V. P. et al., *Breast Cancer Res* 11 (2009): R81
 Palmer, D. H. et al., *Hepatology* 49 (2009): 124-132
 5 Palomba, M. L., *Curr.Oncol Rep.* 14 (2012): 433-440
 Perez, C. A. et al., *Expert.Rev Anticancer Ther.* 11 (2011): 1599-1605
 Phan, G. Q. et al., *Cancer Control* 20 (2013): 289-297
 Pineda, C. T. et al., *Cell* 160 (2015): 715-728
 Pinheiro, J. et al., *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models* ([http://CRAN.R-](http://CRAN.R-project.org/package=nlme)
 10 [project.org/package=nlme](http://CRAN.R-project.org/package=nlme)) (2015)
 Piebanski, M. et al., *Eur.J Immunol* 25 (1995): 1783-1787
 Porta, C. et al., *Virology* 202 (1994): 949-955
 Porter, D. L. et al., *N.Engl.J Med.* 365 (2011): 725-733
 Prasad, M. L. et al., *Head Neck* 26 (2004): 1053-1057
 15 Qian, Z. et al., *Mol.Cancer Res* 12 (2014): 335-347
 Quinn, D. I. et al., *Urol.Oncol.* (2015)
 Raman, J. D. et al., *Carcinogenesis* 27 (2006): 499-507
 Rammensee, H. G. et al., *Immunogenetics* 50 (1999): 213-219
 Reck, M., *Ann.Oncol* 23 Suppl 8 (2012): viii28-viii34
 20 RefSeq, The NCBI handbook [Internet], Chapter 18, (2002),
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21091/>
 Reinisch, C. M. et al., *Int.J Exp.Pathol.* 92 (2011): 326-332
 Reinisch, W. et al., *J Immunother.* 25 (2002): 489-499
 Reinmuth, N. et al., *Dtsch.Med.Wochenschr.* 140 (2015): 329-333
 25 Ries, J. et al., *Int.J Oncol* 26 (2005): 817-824
 Rinaldi, A. et al., *Pathobiology* 77 (2010): 129-135
 Rini, B. I. et al., *Curr.Opin.Oncol.* 20 (2008): 300-306
 Rini, B. I. et al., *Cancer* 107 (2006): 67-74
 Risinger, J. I. et al., *Clin Cancer Res* 13 (2007): 1713-1719
 30 Rock, K. L. et al., *Science* 249 (1990): 918-921
 Rodenko, B. et al., *Nat Protoc.* 1 (2006): 1120-1132
 S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, 032-0100L, (2013)
 S3-Leitlinie Lungenkarzinom, 020/007, (2011)
 S3-Leitlinie maligne Ovarialtumore, 032-0350L, (2013)
 35 S3-Leitlinie Mammakarzinom, 032-0450L, (2012)
 S3-Leitlinie Melanom, 032-0240L, (2013)
 S3-Leitlinie Prostatakarzinom, 043/0220L, (2014)
 Saiki, R. K. et al., *Science* 239 (1988): 487-491
 Salman, B. et al., *Oncoimmunology.* 2 (2013): e26662
 40 Sangro, B. et al., *J Clin Oncol* 22 (2004): 1389-1397
 Schmidt, S. M. et al., *Cancer Res* 64 (2004): 1164-1170
 Seeger, F. H. et al., *Immunogenetics* 49 (1999): 571-576
 Shahzad, M. M. et al., *Cancer Lett.* 330 (2013): 123-129
 Sherman, F. et al., *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics* (1986)
 45 Sherman-Baust, C. A. et al., *Cancer Cell* 3 (2003): 377-386
 Shi, M. et al., *World J Gastroenterol.* 10 (2004): 1146-1151
 Showel, M. M. et al., *FIOOOPrime.Rep.* 6 (2014): 96
 Siegel, S. et al., *Blood* 102 (2003): 4416-4423
 Silva, L. P. et al., *Anal.Chem.* 85 (2013): 9536-9542
 50 Singh-Jasuja, H. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* 53 (2004): 187-195
 Skandalis, S. S. et al., *Matrix Biol* 35 (2014): 182-193
 Small, E. J. et al., *J Clin Oncol.* 24 (2006): 3089-3094
 Smith, M. J. et al., *Br.J Cancer* 100 (2009): 1452-1464
 Son, M. Y. et al., *Stem Cells* 31 (2013): 2374-2387
 55 Springelkamp, H. et al., *Genet.Epidemiol.* 39 (2015): 207-216
 Stahl, M. et al., *Ann.Oncol.* 24 Suppl 6 (2013): vi51-vi56
 Sturm, M. et al., *BMC.Bioinformatics.* 9 (2008): 163
 Su, Z. et al., *Cancer Res.* 63 (2003): 2127-2133
 Sun, H. et al., *J BUON.* 20 (2015): 296-308

- Szajnik, M. et al., *Gynecol.Obstet.(Sunnyvale.) Suppl* 4 (2013): 3
 Szarvas, T. et al., *Int J Cancer* 135 (2014): 1596-1604
 Takayama, T. et al., *Cancer* 68(1991): 2391-2396
 Takayama, T. et al., *Lancet* 356 (2000): 802-807
 5 Tanaka, F. et al., *Int.J Oncol* 10(1997): 1113-1117
 Teufel, R. et al., *Cell Mol Life Sci.* 62 (2005): 1755-1762
 Thakkar, J. P. et al., *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 23 (2014): 1985-1996
 Thorsen, K. et al., *Mol Cell Proteomics.* 7 (2008): 1214-1224
 Tian, X. et al., *J Transl.Med.* 13 (2015): 337
 10 Toomey, P. G. et al., *Cancer Control* 20 (2013): 32-42
 Tradonsky, A. et al., *Am.J Clin Pathol.* 137 (2012): 918-930
 Tran, E. et al., *Science* 344 (2014): 641-645
 Urgard, E. et al., *Cancer Inform.* 10 (2011): 175-183
 van der Bruggen, P. et al., *Immunol.Rev* 188 (2002): 51-64
 15 van, Duin M. et al., *Haematologica* 96 (2011): 1662-1669
 Velinov, N. et al., *Khirurgiia (Sofia)* (2010): 44-49
 Walter, S. et al., *J Immunol* 171 (2003): 4974-4978
 Walter, S. et al., *Nat Med.* 18 (2012): 1254-1261
 Wang, G. H. et al., *Oncol Lett.* 5 (2013): 544-548
 20 Wang, Y. et al., *Anticancer Res* 33 (2013): 207-214
 Wilhelm, S. M. et al., *Cancer Res* 64 (2004): 7099-7109
 Willcox, B. E. et al., *Protein Sci.* 8 (1999): 2418-2423
 Wittig, B. et al., *Hum.Gene Ther.* 12 (2001): 267-278
 Wlodarski, M. W. et al., *J Leukoc.Biol* 83 (2008): 589-601
 25 World Cancer Report, (2014)
 Wu, Z. Y. et al., *Scand.J Immunol.* 74 (2011): 561-567
 Xie, X. et al., *Oncol Lett.* 7 (2014): 1537-1543
 Xiong, D. et al., *Carcinogenesis* 33 (2012): 1797-1805
 Xu, J. et al., *J Mol.Biol* 377 (2008): 28-46
 30 Xu, L. et al., *Zhongguo Fei.Ai.Za Zhi.* 14 (2011): 727-732
 Xu, X. et al., *Exp.Mol.Pathol.* 97 (2014): 579-584
 Xu, Y. et al., *Sci.Rep.* 5 (2015): 12104
 Yakimchuk, K. et al., *Mol.Cell Endocrinol.* 375 (2013): 121-129
 Yamada, R. et al., *Tissue Antigens* 81 (2013): 428-434
 35 Yang, S. et al., *Biochim.Biophys.Acta* 1772 (2007): 1033-1040
 Yao, J. et al., *Cancer Immunol.Res.* 2 (2014): 371-379
 Yin, B. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* 7 (2014a): 2934-2941
 Yu, J. et al., *Gut* 64 (2015): 636-645
 Yu, W. et al., *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 264 (2012): 73-83
 40 Yuan, R. H. et al., *Ann Surg.Oncol* 16 (2009): 1711-1719
 Zamuner, F. T. et al., *Mol.Cancer Ther.* 14 (2015): 828-834
 Zarella, S. et al., *Cancer Res.* 57 (1997): 4570-4577
 Zhan, W. et al., *Clin Res Hepatol.Gastroenterol.* (2015)
 Zhang, H. et al., *Carcinogenesis* 35 (2014): 1863-1871
 45 Zhang, J. et al., *Oncotarget.* 6 (2015): 42040-42052
 Zhang, S. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* 8 (2015): 541-550
 Zhang, X. et al., *Int.J Oncol* (2016)
 Zhao, H. et al., *Zhonghua Gan Zang.Bing.Za Zhi.* 10 (2002): 100-102
 Zou, T. T. et al., *Oncogene* 21 (2002): 4855-4862
 50 Follenzi A, et al. *Nat Genet.* 2000 Jun;25(2):217-22.
 Zufferey R, et al. *J Virol.* 1999 Apr;73(4):2886-92.
 Scholten KB, et al. *Clin Immunol.* 2006 May; 119(2): 135-45.
 Gustafsson C, et al. *Trends Biotechnol.* 2004 Jul;22(7):346-53. Review.
 Kuball, J., et al. (2007). *Blood* 109, 2331-2338.
 55 Schmitt, T. M., et al. (2009). *Hum. Gene Ther.* 20, 1240-1248

LISTARE SECVENTE

<110> Immatics Biotechnologies GmbH

<120> Noi peptide și combinații de peptide pentru utilizare
în imunoterapia împotriva unor diverse tumori

<130> I32799WOEP-A

<150> GB1505305.1

<151> 2015-03-27

<150> US62/139,189

<151> 2015-03-27

<160> 290

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Lys Leu Gln Glu Lys Ile Gln Glu Leu

1 5

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Val Leu Glu Lys Glu Ile Tyr Ser Ile

1 5 10

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Arg Val Ile Asp Asp Ser Leu Val Val Gly Val

1 5 10

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Val Leu Phe Gly Glu Leu Pro Ala Leu

1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Gly Leu Val Asp Ile Met Val His Leu

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Phe Leu Asn Ala Ile Glu Thr Ala Leu

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Ala Leu Leu Gln Ala Leu Met Glu Leu

1 5

<210> 8

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8
 Ala Leu Ser Ser Ser Gln Ala Glu Val
 1 5
 <210> 9
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 Ser Leu Ile Thr Gly Gln Asp Leu Leu Ser Val
 1 5 10
 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 Gln Leu Ile Glu Lys Asn Trp Leu Leu
 1 5
 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 11
 Leu Leu Asp Pro Lys Thr Ile Phe Leu
 1 5
 <210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 Arg Leu Leu Asp Pro Lys Thr Ile Phe Leu
 1 5 10
 <210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 Arg Leu His Asp Glu Asn Ile Leu Leu
 1 5
 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 Tyr Thr Phe Ser Gly Asp Val Gln Leu
 1 5
 <210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 15
 Gly Leu Pro Ser Ala Thr Thr Thr Val
 1 5
 <210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Ser Leu Ala Asp Leu Ser Leu Leu Leu
 1 5
 <210> 17
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 17
 Gly Leu Leu Pro Ser Ala Glu Ser Ile Lys Leu
 1 5 10
 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 18
 Lys Thr Ala Ser Ile Asn Gln Asn Val
 1 5
 <210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 19
 Lys Val Phe Glu Leu Asp Leu Val Thr Leu
 1 5 10
 <210> 20
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 20
 Ala Leu Val Glu Lys Gly Glu Phe Ala Leu
 1 5 10
 <210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 21
 Tyr Leu Met Asp Asp Phe Ser Ser Leu
 1 5
 <210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 22
 Leu Met Tyr Pro Tyr Ile Tyr His Val
 1 5
 <210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 23
 Ala Leu Leu Ser Pro Leu Ser Leu Ala
 1 5
 <210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 24
 Lys Val Trp Ser Asp Val Thr Pro Leu
 1 5

<210> 25
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 25
 Leu Leu Trp Gly His Pro Arg Val Ala Leu Ala
 1 5 10
 <210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 26
 Val Leu Asp Gly Lys Val Ala Val Val
 1 5
 <210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 27
 Gly Leu Leu Gly Lys Val Thr Ser Val
 1 5
 <210> 28
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 28
 Ile Lys Val Thr Asp Pro Gln Leu Leu Glu Leu
 1 5 10
 <210> 29
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 29
 Lys Met Ile Ser Ala Ile Pro Thr Leu
 1 5
 <210> 30
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 30
 Ile Ile Thr Glu Val Ile Thr Arg Leu
 1 5
 <210> 31
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 31
 Gly Leu Leu Glu Thr Thr Gly Leu Leu Ala Thr
 1 5 10
 <210> 32
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 32
 Val Val Met Val Leu Val Leu Met Leu
 1 5
 <210> 33
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Homo sapiens
 <400> 33
 Thr Leu Asp Arg Asn Ser Leu Tyr Val
 1 5
 <210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 34
 Thr Leu Asn Thr Leu Asp Ile Asn Leu
 1 5
 <210> 35
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 35
 Val Ile Ile Lys Gly Leu Glu Glu Ile
 1 5
 <210> 36
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 36
 Thr Val Leu Gln Glu Leu Ile Asn Val
 1 5
 <210> 37
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 37
 Gln Ile Val Glu Leu Ile Glu Lys Ile
 1 5
 <210> 38
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 38
 Val Leu Gln Gln Glu Ser Asn Phe Leu
 1 5
 <210> 39
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 39
 Tyr Leu Glu Asp Gly Phe Ala Tyr Val
 1 5
 <210> 40
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 40
 Lys Ile Trp Glu Glu Leu Ser Val Leu Glu Val
 1 5 10
 <210> 41
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 41
 Ile Val Thr Glu Ile Ile Ser Glu Ile

1 5
 <210> 42
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 42
 Lys Gln Met Ser Ile Ser Thr Gly Leu
 1 5
 <210> 43
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 43
 Leu Leu Ile Pro Phe Thr Ile Phe Met
 1 5
 <210> 44
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 44
 Ala Val Phe Asn Leu Val His Val Val
 1 5
 <210> 45
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 45
 Phe Leu Pro Val Ser Val Val Tyr Val
 1 5
 <210> 46
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 46
 Ile Ser Leu Asp Glu Val Ala Val Ser Leu
 1 5 10
 <210> 47
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 47
 Gly Leu Asn Gly Phe Asn Val Leu Leu
 1 5
 <210> 48
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 48
 Lys Ile Ser Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val
 1 5 10
 <210> 49
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 49
 Lys Leu Ile Gly Asn Ile His Gly Asn Glu Val
 1 5 10
 <210> 50
 <211> 9

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 50
 Ile Leu Leu Ser Val Leu His Gln Leu
 1 5
 <210> 51
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 51
 Leu Asp Ser Glu Ala Leu Leu Thr Leu
 1 5
 <210> 52
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 52
 Thr Ile Gly Ile Pro Phe Pro Asn Val
 1 5
 <210> 53
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 53
 Ala Gln His Leu Ser Thr Leu Leu Leu
 1 5
 <210> 54
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 54
 Tyr Leu Val Pro Gly Leu Val Ala Ala
 1 5
 <210> 55
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 55
 His Leu Phe Asp Lys Ile Ile Lys Ile
 1 5
 <210> 56
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 56
 Val Leu Gln Glu Asn Ser Ser Asp Tyr Gln Ser Asn Leu
 1 5 10
 <210> 57
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 57
 Thr Leu Tyr Pro Gly Arg Phe Asp Tyr Val
 1 5 10
 <210> 58
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 58

His Leu Leu Gly Glu Gly Ala Phe Ala Gln Val

1 5 10

<210> 59

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Ala Leu Ala Asp Gly Ile Lys Ser Phe Leu Leu

1 5 10

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Tyr Leu Phe Ser Gln Gly Leu Gln Gly Leu

1 5 10

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Ala Leu Tyr Pro Lys Glu Ile Thr Leu

1 5

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Ser Leu Val Glu Asn Ile His Val Leu

1 5

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Lys Leu Leu Pro Met Val Ile Gln Leu

1 5

<210> 64

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Ser Leu Tyr Ala Gly Ser Asn Asn Gln Val

1 5 10

<210> 65

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Ser Leu Ser Glu Lys Ser Pro Glu Val

1 5

<210> 66

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

Ala Met Phe Pro Asp Thr Ile Pro Arg Val

1 5 10

<210> 67

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 67
 Phe Leu Ile Glu Asn Leu Leu Ala Ala
 1 5
 <210> 68
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 68
 Gln Leu Met Asn Leu Ile Arg Ser Val
 1 5
 <210> 69
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 69
 Leu Lys Val Leu Lys Ala Asp Val Val Leu
 1 5 10
 <210> 70
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 70
 Gly Leu Thr Glu Lys Thr Val Leu Val
 1 5
 <210> 71
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 71
 His Met Ser Gly Lys Leu Thr Asn Val
 1 5
 <210> 72
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 72
 Val Leu Ser Thr Arg Val Thr Asn Val
 1 5
 <210> 73
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 73
 Ser Val Pro Lys Thr Leu Gly Val
 1 5
 <210> 74
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 74
 Gly Leu Ala Phe Leu Pro Ala Ser Val
 1 5
 <210> 75
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 75
 Ala Leu Leu Asp Gly Ala Leu Gln Leu
 1 5
 <210> 76
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 76
 Phe Thr Ala Glu Phe Leu Glu Lys Val
 1 5
 <210> 77
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 77
 Ala Leu Tyr Gly Asn Val Gln Gln Val
 1 5
 <210> 78
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 78
 Leu Phe Gln Ser Arg Ile Ala Gly Val
 1 5
 <210> 79
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 79
 Thr Val Leu Glu Glu Ile Gly Asn Arg Val
 1 5 10
 <210> 80
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 80
 Val Leu Thr Gly Gln Val His Glu Leu
 1 5
 <210> 81
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 81
 Ile Leu Ala Glu Glu Pro Ile Tyr Ile
 1 5
 <210> 82
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 82
 Ile Leu Ala Glu Glu Pro Ile Tyr Ile Arg Val
 1 5 10
 <210> 83
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 83
 Gly Leu Leu Glu Asn Ser Pro His Leu
 1 5

<210> 84
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 84
 Phe Leu Leu Glu Arg Glu Gln Leu Leu
 1 5
 <210> 85
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 85
 Lys Leu Leu Asp Lys Pro Glu Gln Phe Leu
 1 5 10
 <210> 86
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 86
 Ser Leu Phe Ser Asn Ile Glu Ser Val
 1 5
 <210> 87
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 87
 Lys Leu Leu Ser Leu Leu Glu Glu Ala
 1 5
 <210> 88
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 88
 Leu Leu Leu Pro Leu Glu Leu Ser Leu Ala
 1 5 10
 <210> 89
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 89
 Ser Leu Ala Glu Thr Ile Phe Ile Val
 1 5
 <210> 90
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 90
 Ala Ile Leu Asn Val Asp Glu Lys Asn Gln Val
 1 5 10
 <210> 91
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 91
 Leu Leu Pro Ser Ile Phe Leu Met Val
 1 5
 <210> 92
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Homo sapiens
 <400> 92
 Arg Leu Phe Glu Glu Val Leu Gly Val
 1 5
 <210> 93
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 93
 Arg Leu Tyr Gly Tyr Phe His Asp Ala
 1 5
 <210> 94
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 94
 Tyr Leu Asp Glu Val Ala Phe Met Leu
 1 5
 <210> 95
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 95
 Lys Leu Ile Asp Glu Asp Glu Pro Leu Phe Leu
 1 5 10
 <210> 96
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 96
 Ala Leu Asp Thr Thr Arg His Glu Leu
 1 5
 <210> 97
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 97
 Lys Leu Phe Glu Lys Ser Thr Gly Leu
 1 5
 <210> 98
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 98
 Phe Val Gln Glu Lys Ile Pro Glu Leu
 1 5
 <210> 99
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 99
 Thr Leu Phe Gly Ile Gln Leu Thr Glu Ala
 1 5 10
 <210> 100
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 100
 Ala Leu Gln Ser Phe Glu Phe Arg Val

1 5
 <210> 101
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 101
 Ser Leu Leu Glu Val Asn Glu Ala Ser Ser Val
 1 5 10
 <210> 102
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 102
 Gly Leu Tyr Pro Val Thr Leu Val Gly Val
 1 5 10
 <210> 103
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 103
 Tyr Leu Ala Asp Thr Val Gln Lys Leu
 1 5
 <210> 104
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 104
 Asp Leu Pro Thr Gln Glu Pro Ala Leu Gly Thr Thr
 1 5 10
 <210> 105
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 105
 Ala Met Leu Ala Ser Gln Thr Glu Ala
 1 5
 <210> 106
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 106
 Val Leu Leu Gly Ser Val Val Ile Phe Ala
 1 5 10
 <210> 107
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 107
 Arg Val Leu Pro Gly Gln Ala Val Thr Gly Val
 1 5 10
 <210> 108
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 108
 Phe Ile Ala Asn Leu Pro Pro Glu Leu Lys Ala
 1 5 10
 <210> 109
 <211> 9

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 109
 Ile Leu Gly Ser Phe Glu Leu Gln Leu
 1 5
 <210> 110
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 110
 Gln Ile Gln Gly Gln Val Ser Glu Val
 1 5
 <210> 111
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 111
 Ala Gln Leu Glu Gly Lys Leu Val Ser Ile
 1 5 10
 <210> 112
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 112
 Ile Leu Ala Gln Asp Val Ala Gln Leu
 1 5
 <210> 113
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 113
 Phe Leu Phe Leu Lys Glu Val Lys Val
 1 5
 <210> 114
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 114
 Leu Leu Phe Pro Ser Asp Val Gln Thr Leu
 1 5 10
 <210> 115
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 115
 Ile Leu His Gly Glu Val Asn Lys Val
 1 5
 <210> 116
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 116
 Ala Leu Leu Ser Ser Val Ala Glu Ala
 1 5
 <210> 117
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 117

Thr Leu Leu Glu Gly Ile Ser Arg Ala

1 5

<210> 118

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 118

Ile Ala Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ala Leu

1 5 10

<210> 119

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 119

Ser Leu Ile Glu Glu Ser Glu Glu Leu

1 5

<210> 120

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 120

Leu Gln Leu Ser Pro Leu Lys Gly Leu Ser Leu

1 5 10

<210> 121

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 121

Ala Leu Tyr Val Gln Ala Pro Thr Val

1 5

<210> 122

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 122

Ser Ile Ile Asp Thr Glu Leu Lys Val

1 5

<210> 123

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 123

Gln Thr Ala Pro Glu Glu Ala Phe Ile Lys Leu

1 5 10

<210> 124

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 124

Ala Leu Leu Leu Arg Leu Phe Thr Ile

1 5

<210> 125

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 125

Ala Ala Leu Glu Val Leu Ala Glu Val

1 5

<210> 126

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 126
 Gln Leu Arg Glu Ala Phe Glu Gln Leu
 1 5
 <210> 127
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 127
 Ile Met Lys Ala Thr Gly Leu Gly Ile Gln Leu
 1 5 10
 <210> 128
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 128
 Ser Ile Leu Thr Asn Ile Ser Glu Val
 1 5
 <210> 129
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 129
 Lys Met Ala Ser Lys Val Thr Gln Val
 1 5
 <210> 130
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 130
 Gln Leu Tyr Gly Ser Ala Ile Thr Leu
 1 5
 <210> 131
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 131
 Ser Leu Tyr Pro His Phe Thr Leu Leu
 1 5
 <210> 132
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 132
 Ala Leu Leu Asn Asn Val Ile Glu Val
 1 5
 <210> 133
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 133
 Phe Leu Asp Gly Arg Pro Leu Thr Leu
 1 5
 <210> 134
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 134
 Ser Leu Tyr Lys Ser Phe Leu Gln Leu
 1 5
 <210> 135
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 135
 His Leu Asp Thr Val Lys Ile Glu Val
 1 5
 <210> 136
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 136
 Leu Leu Trp Asp Ala Pro Ala Lys Cys
 1 5
 <210> 137
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 137
 Lys Leu Ile Tyr Lys Asp Leu Val Ser Val
 1 5 10
 <210> 138
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 138
 Gly Ile Ile Asn Lys Leu Val Thr Val
 1 5
 <210> 139
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 139
 Ile Ile Leu Glu Asn Ile Gln Ser Leu
 1 5
 <210> 140
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 140
 Phe Leu Asp Ser Gln Ile Thr Thr Val
 1 5
 <210> 141
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 141
 Asn Ile Asp Ile Asn Asn Asn Glu Leu
 1 5
 <210> 142
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 142
 Leu Leu Asp Ala Ala His Ala Ser Ile
 1 5

<210> 143
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 143
 Met Leu Trp Glu Ser Ile Met Arg Val
 1 5
 <210> 144
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 144
 Phe Leu Ile Ser Gln Thr Pro Leu Leu
 1 5
 <210> 145
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 145
 Ala Leu Glu Glu Lys Leu Glu Asn Val
 1 5
 <210> 146
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 146
 Val Val Ala Ala His Leu Ala Gly Ala
 1 5
 <210> 147
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 147
 Gly Leu Leu Ser Ala Leu Glu Asn Val
 1 5
 <210> 148
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 148
 Tyr Leu Ile Leu Ser Ser His Gln Leu
 1 5
 <210> 149
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 149
 Asn Met Ala Asp Gly Gln Leu His Gln Val
 1 5 10
 <210> 150
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 150
 Val Leu Leu Asp Met Val His Ser Leu
 1 5
 <210> 151
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Homo sapiens
<400> 151
Asp Ile Ser Lys Arg Ile Gln Ser Leu
1 5
<210> 152
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 152
Ile Leu Val Thr Ser Ile Phe Phe Leu
1 5
<210> 153
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 153
Lys Leu Val Glu Leu Glu His Thr Leu
1 5
<210> 154
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 154
Ala Ile Ile Lys Glu Ile Gln Thr Val
1 5
<210> 155
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 155
Thr Leu Asp Ser Tyr Leu Lys Ala Val
1 5
<210> 156
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 156
Val Ile Leu Thr Ser Ser Pro Phe Leu
1 5
<210> 157
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 157
Ile Leu Gln Asp Gly Gln Phe Leu Val
1 5
<210> 158
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 158
Tyr Leu Asp Pro Leu Trp His Gln Leu
1 5
<210> 159
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 159
Gln Leu Gly Pro Val Pro Val Thr Ile

1 5
 <210> 160
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 160
 Thr Leu Gln Glu Trp Leu Thr Glu Val
 1 5
 <210> 161
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 161
 Asn Leu Leu Asp Glu Asn Val Cys Leu
 1 5
 <210> 162
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 162
 Gly Leu Leu Gly Asn Leu Leu Thr Ser Leu
 1 5 10
 <210> 163
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 163
 Gly Leu Glu Glu Arg Leu Tyr Thr Ala
 1 5
 <210> 164
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 164
 Met Leu Ile Ile Arg Val Pro Ser Val
 1 5
 <210> 165
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 165
 Ser Leu Leu Asp Tyr Glu Val Ser Ile
 1 5
 <210> 166
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 166
 Leu Leu Gly Asp Ser Ser Phe Phe Leu
 1 5
 <210> 167
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 167
 Leu Val Val Asp Glu Gly Ser Leu Val Ser Val
 1 5 10
 <210> 168
 <211> 10

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 168
 Val Ile Phe Glu Gly Glu Pro Met Tyr Leu
 1 5 10
 <210> 169
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 169
 Ala Leu Ala Asp Leu Ser Val Ala Val
 1 5
 <210> 170
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 170
 Phe Ile Ala Ala Val Val Glu Lys Val
 1 5
 <210> 171
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 171
 Leu Leu Leu Leu Asp Val Pro Thr Ala
 1 5
 <210> 172
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 172
 Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu
 1 5 10
 <210> 173
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 173
 Arg Leu Ile Asp Ile Tyr Lys Asn Val
 1 5
 <210> 174
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 174
 Ala Leu Tyr Ser Gly Asp Leu His Ala Ala
 1 5 10
 <210> 175
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 175
 Ser Leu Leu Asp Leu Val Gln Ser Leu
 1 5
 <210> 176
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 176

Val Gln Ser Gly Leu Arg Ile Leu Leu

1 5

<210> 177

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 177

Ala Leu Ile Asn Val Leu Asn Ala Leu

1 5

<210> 178

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 178

Ser Leu Val Ser Trp Gln Leu Leu Leu

1 5

<210> 179

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 179

Thr Leu Gly Glu Ile Ile Lys Gly Val

1 5

<210> 180

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 180

Arg Leu Tyr Glu Glu Glu Ile Arg Ile

1 5

<210> 181

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 181

Leu Leu Trp Ala Pro Thr Ala Gln Ala

1 5

<210> 182

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 182

Gly Leu Gln Asp Gly Phe Gln Ile Thr Val

1 5 10

<210> 183

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 183

Ala Leu Ser Tyr Ile Leu Pro Tyr Leu

1 5

<210> 184

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 184

Ala Leu Asp Ser Thr Ile Ala His Leu

1 5

<210> 185

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 185
 Thr Leu Tyr Gln Gly Leu Pro Ala Glu Val
 1 5 10
 <210> 186
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 186
 Ser Leu Leu Ser Leu Glu Ser Arg Leu
 1 5
 <210> 187
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 187
 Ser Ile Leu Lys Glu Asp Pro Phe Leu
 1 5
 <210> 188
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 188
 Val Leu Gly Glu Glu Gln Glu Gly Val
 1 5
 <210> 189
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 189
 Met Ala Val Ser Asp Leu Leu Ile Leu
 1 5
 <210> 190
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 190
 Ser Leu Ser Thr Glu Leu Phe Lys Val
 1 5
 <210> 191
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 191
 Ala Ala Ile Glu Ile Phe Glu Lys Val
 1 5
 <210> 192
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 192
 Thr Leu Leu Pro Ser Ser Gly Leu Val Thr Leu
 1 5 10
 <210> 193
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 193
 Ala Leu Phe His Met Asn Ile Leu Leu
 1 5
 <210> 194
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 194
 Lys Leu Leu Glu Glu Val Gln Leu Leu
 1 5
 <210> 195
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 195
 Val Ile Ile Gln Asn Leu Pro Ala Leu
 1 5
 <210> 196
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 196
 Thr Leu His Gln Trp Ile Tyr Tyr Leu
 1 5
 <210> 197
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 197
 Leu Gly Gly Pro Thr Ser Leu Leu His Val
 1 5 10
 <210> 198
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 198
 Ile Leu Thr Asn Lys Val Val Ser Val
 1 5
 <210> 199
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 199
 Ser Val Ala Asp Leu Ala His Val Leu
 1 5
 <210> 200
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 200
 Ile Met Pro Thr Phe Asp Leu Thr Lys Val
 1 5 10
 <210> 201
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 201
 Leu Leu Phe Ser Leu Leu Cys Glu Ala
 1 5

<210> 202
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 202
 Ala Leu Ala Lys Asp Glu Leu Ser Leu
 1 5
 <210> 203
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 203
 Phe Leu Phe Val Asp Pro Glu Leu Val
 1 5
 <210> 204
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 204
 Ser Glu Trp Gly Ser Pro His Ala Ala Val Pro
 1 5 10
 <210> 205
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 205
 Leu Ala Phe Gly Tyr Asp Asp Glu Leu
 1 5
 <210> 206
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 206
 Gly Leu Asp Ala Phe Arg Ile Phe Leu
 1 5
 <210> 207
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 207
 Lys Leu Phe Glu Thr Val Glu Glu Leu
 1 5
 <210> 208
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 208
 His Leu Asn Asn Asp Arg Asn Pro Leu
 1 5
 <210> 209
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 209
 Val Leu Gln Thr Glu Glu Leu Val Ala Asn
 1 5 10
 <210> 210
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Homo sapiens
 <400> 210
 Gly Leu Ala Gly Asp Asn Ile Tyr Leu
 1 5
 <210> 211
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 211
 Leu Leu Thr Thr Val Leu Ile Asn Ala
 1 5
 <210> 212
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 212
 Met Thr Leu Ser Glu Ile His Ala Val
 1 5
 <210> 213
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 213
 Ile Leu Ala Val Asp Gly Val Leu Ser Val
 1 5 10
 <210> 214
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 214
 Ala Leu Phe Glu Thr Leu Ile Gln Leu
 1 5
 <210> 215
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 215
 Gln Ile Ala Asp Ile Val Thr Ser Val
 1 5
 <210> 216
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 216
 Ala Leu Ser Thr Val Thr Pro Arg Ile
 1 5
 <210> 217
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 217
 Leu Leu Trp Pro Ser Ser Val Pro Ala
 1 5
 <210> 218
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 218
 Ser Leu Thr Gly Ala Asn Ile Thr Val

1 5
 <210> 219
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 219
 Gly Val Val Pro Thr Ile Gln Lys Val
 1 5
 <210> 220
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 220
 Ala Leu Ser Glu Leu Glu Arg Val Leu
 1 5
 <210> 221
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 221
 Ile Met Leu Asn Ser Val Glu Glu Ile
 1 5
 <210> 222
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 222
 Leu Leu Thr Gly Val Phe Ala Gln Leu
 1 5
 <210> 223
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 223
 Ala Leu His Pro Val Gln Phe Tyr Leu
 1 5
 <210> 224
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 224
 Leu Leu Phe Asp Trp Ser Gly Thr Gly Arg Ala Asp Ala
 1 5 10
 <210> 225
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 225
 Phe Leu Pro Gln Pro Val Pro Leu Ser Val
 1 5 10
 <210> 226
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 226
 Ser Leu Ala Gly Asn Leu Gln Glu Leu
 1 5
 <210> 227
 <211> 9

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 227
 Ser Glu Met Glu Glu Leu Pro Ser Val
 1 5
 <210> 228
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 228
 Ser Leu Leu Glu Leu Asp Gly Ile Asn Leu Arg Leu
 1 5 10
 <210> 229
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 229
 Tyr Leu Tyr Glu Leu Glu His Ala Leu
 1 5
 <210> 230
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 230
 Lys Leu Leu Asn Met Ile Phe Ser Ile
 1 5
 <210> 231
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 231
 Leu Leu Asp Asp Ile Phe Ile Arg Leu
 1 5
 <210> 232
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 232
 Leu Val Val Gly Gly Ile Ala Thr Val
 1 5
 <210> 233
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 233
 Ser Leu Phe Glu Ser Leu Glu Tyr Leu
 1 5
 <210> 234
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 234
 Val Leu Leu Asn Glu Ile Leu Glu Gln Val
 1 5 10
 <210> 235
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 235

Ser Leu Leu Asn Gln Pro Lys Ala Val

1 5

<210> 236

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 236

Lys Met Ser Glu Leu Gln Thr Tyr Val

1 5

<210> 237

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 237

Ala Leu Leu Glu Gln Thr Gly Asp Met Ser Leu

1 5 10

<210> 238

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 238

His Leu Gln Glu Lys Leu Gln Ser Leu

1 5

<210> 239

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 239

Val Ile Ile Lys Gly Leu Glu Glu Ile Thr Val

1 5 10

<210> 240

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 240

Ser Val Gln Glu Asn Ile Gln Gln Lys

1 5

<210> 241

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 241

Lys Gln Phe Glu Gly Thr Val Glu Ile

1 5

<210> 242

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 242

Lys Leu Gln Glu Glu Ile Pro Val Leu

1 5

<210> 243

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 243

Gly Leu Ala Glu Phe Gln Glu Asn Val

1 5

<210> 244

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 244
 Asn Val Ala Glu Ile Val Ile His Ile
 1 5
 <210> 245
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 245
 Ala Leu Leu Glu Glu Glu Glu Gly Val
 1 5
 <210> 246
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 246
 Ala Leu Ala Gly Ile Val Thr Asn Val
 1 5
 <210> 247
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 247
 Asn Leu Leu Ile Asp Asp Lys Gly Thr Ile Lys Leu
 1 5 10
 <210> 248
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 248
 Val Leu Met Gln Asp Ser Arg Leu Tyr Leu
 1 5 10
 <210> 249
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 249
 Tyr Leu Tyr Gln Ile Leu Gln Gly Ile
 1 5
 <210> 250
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 250
 Leu Met Gln Asp Ser Arg Leu Tyr Leu
 1 5
 <210> 251
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 251
 Leu Leu Trp Gly Asn Leu Pro Glu Ile
 1 5
 <210> 252
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 252
 Ser Leu Met Glu Lys Asn Gln Ser Leu
 1 5
 <210> 253
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 253
 Lys Leu Leu Ala Val Ile His Glu Leu
 1 5
 <210> 254
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 254
 Ala Leu Gly Asp Lys Phe Leu Leu Arg Val
 1 5 10
 <210> 255
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 255
 Phe Leu Met Lys Asn Ser Asp Leu Tyr Gly Ala
 1 5 10
 <210> 256
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 256
 Phe Leu Asn Asp Ile Phe Glu Arg Ile
 1 5
 <210> 257
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 257
 Lys Leu Ile Asp His Gln Gly Leu Tyr Leu
 1 5 10
 <210> 258
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 258
 Gln Leu Val Gln Arg Val Ala Ser Val
 1 5
 <210> 259
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 259
 Gly Pro Gly Ile Phe Pro Pro Pro Pro Gln Pro
 1 5 10
 <210> 260
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 260
 Ala Leu Asn Glu Ser Leu Val Glu Cys
 1 5

<210> 261
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 261
 Gly Leu Ala Ala Leu Ala Val His Leu
 1 5
 <210> 262
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 262
 Leu Leu Leu Glu Ala Val Trp His Leu
 1 5
 <210> 263
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 263
 Ser Ile Ile Glu Tyr Leu Pro Thr Leu
 1 5
 <210> 264
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 264
 Thr Leu His Asp Gln Val His Leu Leu
 1 5
 <210> 265
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 265
 Phe Leu Leu Asp Lys Pro Gln Asp Leu Ser Ile
 1 5 10
 <210> 266
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 266
 Phe Leu Leu Asp Lys Pro Gln Asp Leu
 1 5
 <210> 267
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 267
 Tyr Leu Leu Asp Met Pro Leu Trp Tyr Leu
 1 5 10
 <210> 268
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 268
 Ser Leu Asp Lys Asp Ile Val Ala Leu
 1 5
 <210> 269
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Homo sapiens
 <400> 269
 Gly Leu Leu Asp Cys Pro Ile Phe Leu
 1 5
 <210> 270
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 270
 Thr Leu Leu Thr Phe Phe His Glu Leu
 1 5
 <210> 271
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 271
 Val Leu Ile Glu Tyr Asn Phe Ser Ile
 1 5
 <210> 272
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 272
 Phe Val Met Glu Gly Glu Pro Pro Lys Leu
 1 5 10
 <210> 273
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 273
 Ser Leu Asn Lys Gln Ile Glu Thr Val
 1 5
 <210> 274
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 274
 Thr Leu Tyr Asn Pro Glu Arg Thr Ile Thr Val
 1 5 10
 <210> 275
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 275
 Ala Val Pro Pro Pro Pro Ser Ser Val
 1 5
 <210> 276
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 276
 Arg Met Pro Thr Val Leu Gln Cys Val
 1 5
 <210> 277
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 277
 Lys Leu Gln Glu Glu Leu Asn Lys Val

1 5
 <210> 278
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 278
 Val Leu Glu Asp Lys Val Leu Ser Val
 1 5
 <210> 279
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 279
 Val Leu Met Asp Glu Gly Ala Val Leu Thr Leu
 1 5 10
 <210> 280
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 280
 His Leu Trp Gly His Ala Leu Phe Leu
 1 5
 <210> 281
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 281
 Leu Leu Leu Glu Ser Asp Pro Lys Val Tyr Ser Leu
 1 5 10
 <210> 282
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 282
 Ser Leu Tyr Ala Leu His Val Lys Ala
 1 5
 <210> 283
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 283
 Ala Leu Ser Glu Leu Leu Gln Gln Val
 1 5
 <210> 284
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 284
 Lys Leu Met Asp Pro Gly Ser Leu Pro Pro Leu
 1 5 10
 <210> 285
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 285
 Met Leu Leu Asp Thr Val Gln Lys Val
 1 5
 <210> 286
 <211> 9

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 286
 Phe Leu Thr Glu Met Val His Phe Ile
 1 5
 <210> 287
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 287
 Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val
 1 5
 <210> 288
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 288
 Ser Leu Tyr Lys Gly Leu Leu Ser Val
 1 5
 <210> 289
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 289
 Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
 1 5 10
 <210> 290
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 290
 Tyr Leu Leu Pro Ala Ile Val His Ile
 1 5
 - 1 -

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- MICHAL BASSANI-STERMBERG ET AL: "Mass Spectrometry of Human Leukocyte Antigen Class I Peptidomes Reveals Strong Effects of Protein Abundance and Turnover on Antigen Presentation", MOLECULAR & CELLULAR PROTEOMICS, vol. 14, no. 3, 2 March 2015 (2015-03-02), pages 658-673, XP055272560, ISSN: 1535-9476, DOI: 10.1074/mcp.M114.042812
- WO-A1-2015/018805
- SEBASTIAN P HAEN ET AL: "The repertoire of human tumor-associated epitopes - identification and selection of antigens and their application in clinical trials", CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY, vol. 25, no. 2, 1 April 2013 (2013-04-01), pages 277-283, XP055212257, ISSN: 0952-7915, DOI: 10.1016/j.coi.2013.03.007
- WO-A2-02/086443

(57) Revendicări:

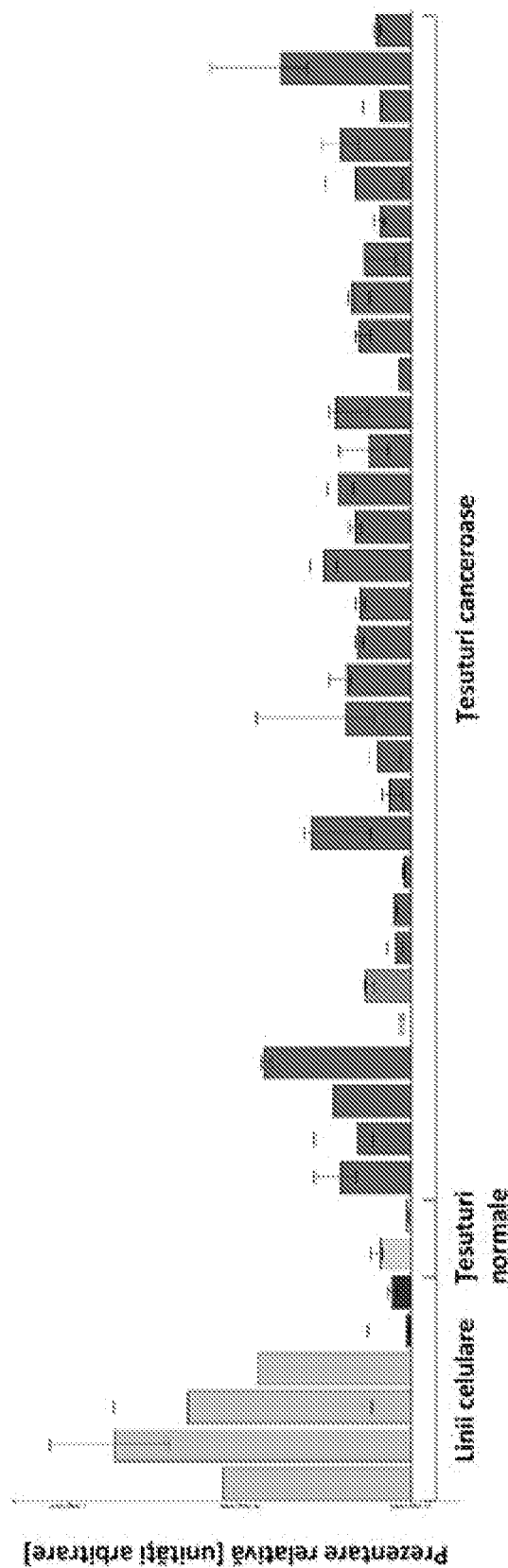
1. O peptidă care cuprinde o secvență de aminoacizi constând din SEQ ID NO: 25; și o sare farmaceutică acceptabilă a acesteia și în care respectiva peptidă are o lungime totală de la 11 la 16 aminoacizi.
2. Peptida conform Revendicării 1, în care respectiva peptidă constă dintr-o secvență de aminoacizi conform SEQ ID NO: 25.
3. Peptida conform Revendicării 1 sau 2, în care respectiva peptidă include legături non-peptidice.
4. Un receptor de celule T, de preferință un receptor de celule T recombinant, solubil sau legat de membrană, care este reactiv cu un ligand HLA în complex cu HLA, în care ligandul respectiv are cel puțin 88% identitate cu o secvență de aminoacizi conform SEQ ID NO: 25 și, de preferință, constă din secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 25.
5. Un anticorp, în special un anticorp solubil sau legat de membrană, care recunoaște în mod specific o peptidă constând dintr-o secvență de aminoacizi conform SEQ ID NO: 25 atunci când este legată de o moleculă MHC.
6. Un acid nucleic care codifică pentru o peptidă conform uneia dintre Revendicările 1–3 sau pentru un TCR conform Revendicării 4 ori pentru un anticorp conform Revendicării 5, legat în mod opțional de o secvență promotoare heterologă, sau un vector de exprimare care exprimă acidul nucleic menționat.
7. O celulă-gazdă recombinantă care cuprinde peptida conform oricăreia dintre Revendicările 1–3 sau acidul nucleic sau vectorul de exprimare conform Revendicării 6, în care respectiva celulă-gazdă este, de preferință, o celulă prezentatoare de antigen, cum ar fi o celulă dendritică, sau în care respectiva celulă-gazdă este, de preferință, o celulă T sau o celulă NK.
8. Metodă de producere a peptidei conform oricăreia dintre Revendicările 1–3 sau de producere a receptorului de celule T conform Revendicării 4 ori a unui anticorp conform Revendicării 5, metoda cuprinzând cultivarea celulei-gazdă conform Revendicării 8 care prezintă peptida conform oricăreia dintre Revendicările 1–3 sau care exprimă acidul nucleic sau vectorul de exprimare conform Revendicării 7 și izolarea peptidei sau a TCR-ului sau a anticorpului din celula-gazdă sau din mediul de cultură al acesteia.
9. O metodă *in vitro* pentru producerea de limfocite T activate, metoda cuprinzând punerea în contact a celulelor T *in vitro* cu molecule MHC de clasă I umane încărcate cu antigen, exprimate pe suprafața unei celule prezentatoare de antigen adecvate sau a unei construcții artificiale care imită o celulă prezentatoare de antigen, pentru o perioadă de timp suficientă pentru a activa celulele T respective într-o manieră specifică antigenului, în care antigenul respectiv este o peptidă constând dintr-o secvență de aminoacizi conform SEQ ID NO: 25.
10. O limfocită T activată, produsă prin metoda conform Revendicării 9, care recunoaște selectiv o celulă care prezintă o polipeptidă care cuprinde o secvență de aminoacizi de la oricare dintre Revendicările 1 sau 2.
11. O compoziție farmaceutică care cuprinde cel puțin un ingredient activ selectat din grupul format din peptida conform oricăreia dintre Revendicările 1–3, acidul nucleic sau vectorul de exprimare conform Revendicării 6, celula conform Revendicării 7, limfocita T activată conform Revendicării 10 sau anticorpul conform Revendicării 5 ori receptorul de celule T conform Revendicării 5 și un suport acceptabil din punct de vedere farmaceutic și, opțional, excipienți și/sau stabilizatori suplimentari acceptați din punct de vedere farmaceutic.
12. Peptida conform oricăreia dintre Revendicările 1–3, acidul nucleic sau vectorul de exprimare conform Revendicării 6, celula conform Revendicării 7, limfocita T activată conform Revendicării 10 sau anticorpul conform Revendicării 5 ori receptorul de celule T conform Revendicării 5 pentru utilizare în medicină, de preferință pentru utilizare în diagnosticarea și/sau tratamentul cancerului sau pentru utilizare în fabricarea unui medicament împotriva cancerului.
13. Peptida conform oricăreia dintre Revendicările 1–3, acidul nucleic sau vectorul de exprimare conform Revendicării 6, celula conform Revendicării 7, limfocita T activată conform Revendicării 10 sau anticorpul conform Revendicării 5 ori receptorul de celule T conform Revendicării 4 pentru utilizare în diagnosticarea și/sau tratamentul cancerului sau pentru utilizarea la fabricarea unui medicament împotriva cancerului conform Revendicării 13, în care cancerul respectiv este selectat din grupul de carcinom hepatocelular (HCC), carcinom colorectal (CRC), glioblastom (GB), cancer gastric (GC), cancer esofagian, cancer pulmonar non-microcelular (NSCLC), cancer pancreatic (PC), carcinom cu celule renale (RCC), hiperplazie benignă de prostată (BPH), cancer de prostată (PCA), cancer ovarian (OC), melanom, cancer de glandă mamară, leucemie limfocitară cronică (CLL), carcinom cu celule

Merkel (MCC), cancer pulmonar microcelular (SCLC), limfom non-Hodgkin (NHL), leucemie mieloidă acută (AML), cancer de vezică biliară și colangiocarcinom (GBC, CCC), cancer de vezică urinară (UBC), cancer uterin (UEC) și alte tumori care prezintă o supraexprimare a unei proteine din care este derivată peptida din SEQ ID NO: 25.

14. O trusă care cuprinde:

- a) un recipient care conține o compoziție farmaceutică care conține peptida conform oricăreia dintre Revendicările 1–3, acidul nucleic sau vectorul de exprimare conform Revendicării 6, celula conform Revendicării 7, limfocitele T activate conform Revendicării 10 sau anticorpul conform Revendicării 5 ori receptorul de celule T conform Revendicării 4, în soluție sau sub formă liofilizată;
- b) opțional, un al doilea recipient care conține un diluant sau o soluție de reconstituire pentru forma liofilizată;
- c) opțional, instrucțiuni pentru (i) utilizarea soluției sau (ii) reconstituirea și/sau utilizarea formulei și
- d) opțional, mai cuprinde unul sau mai multe dintre (iii) o soluție-tampon, (iv) un diluant, (v) un filtru, (vi) un ac sau (vii) o seringă.

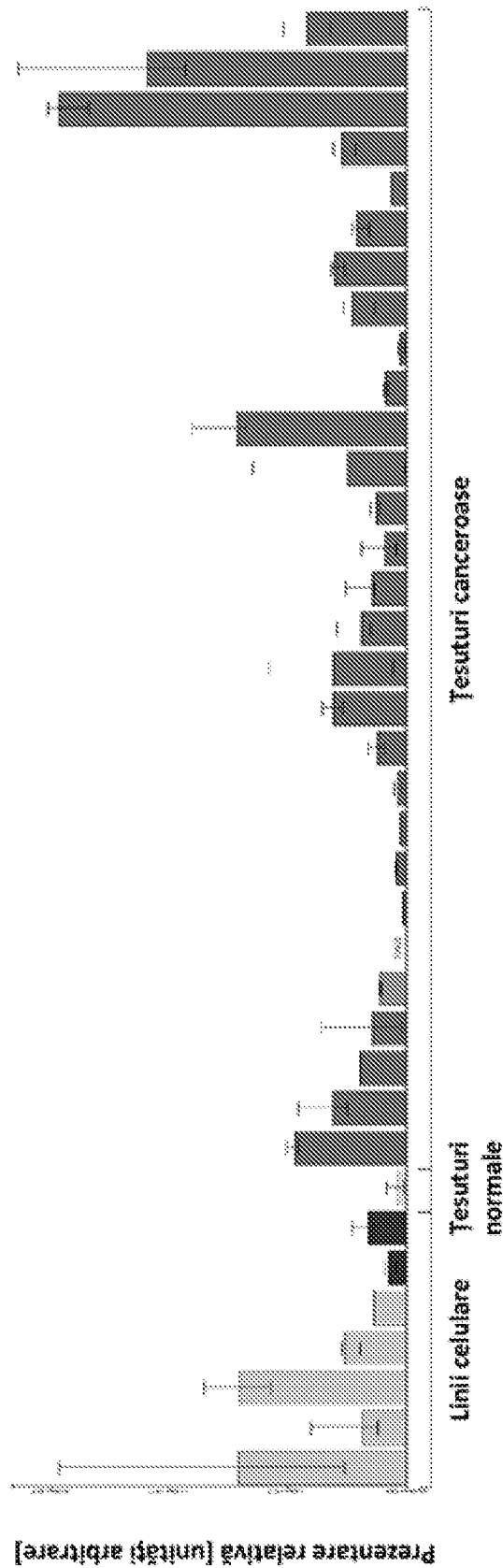
Figura 1A - Peptidă: KLQEKIQEL (A°02:01)



Peptidă detectată pe

4 linii celulare de cancer leucocitar, 1 linie celulară de cancer pancreatic, 1 linie celulară de melanom, 2 țesuturi normale (1 glandă suprarenală, 1 splină), 31 de țesuturi canceroase (1 cancer cerebral, 4 cancere de colon, 1 cancer esofagian, 1 cancer renal, 2 cancere hepatice, 16 cancere pulmonare, 4 cancere ovariene, 1 cancer rectal, 1 cancer gastric) (de la stânga la dreapta)

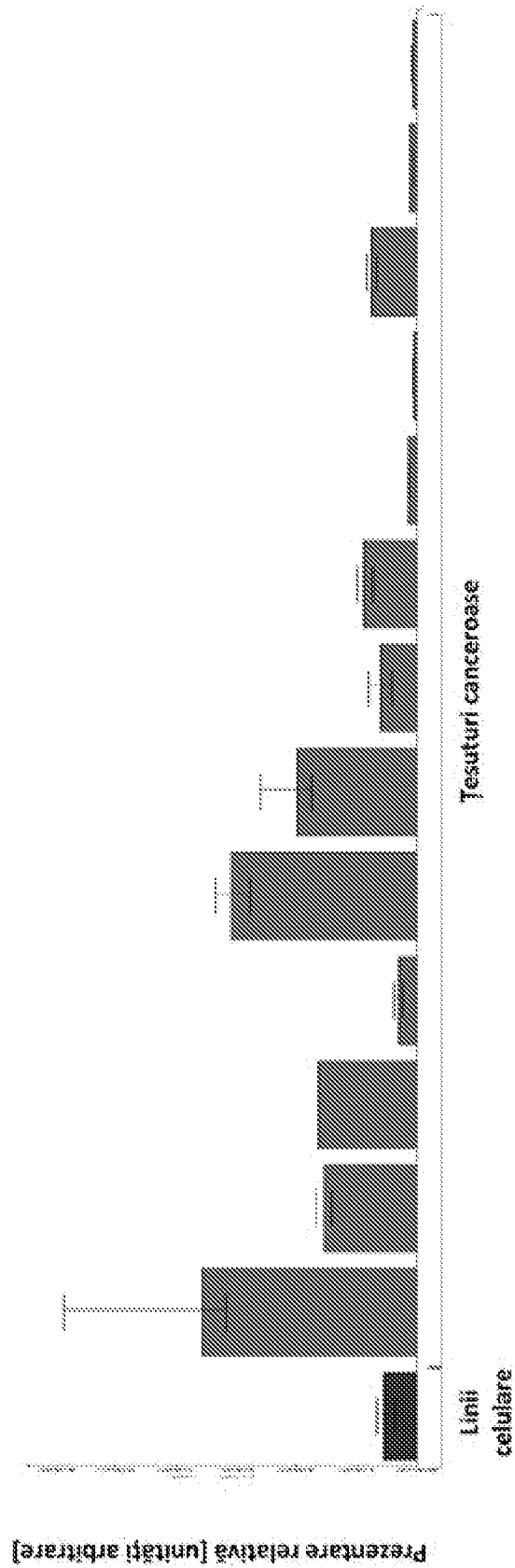
Figura 1B - Peptidă: QLEKNWLL (A*02:01)



Peptidă detectată pe

5 linii celulare de cancer leucocitar, 1 linie celulară de cancer pancreatic, 1 linie celulară de leucemie mieloidă, 1 țesut normal (1 glandă suprarenală), 29 de țesuturi canceroase (4 cancere de colon, 2 cancere esofagiene, 1 cancer leucocitar, 1 cancer hepatic, 10 cancere pulmonare, 11 cancere ovariene) (de la stânga la dreapta)

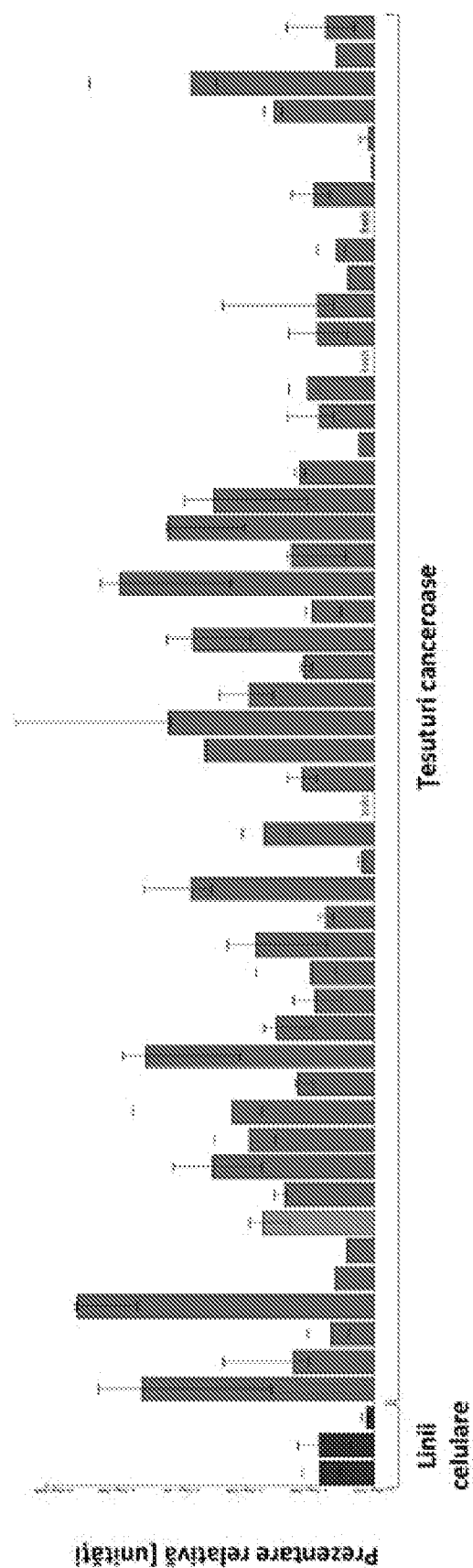
Figura 1C - Peptidă: LLDPKTIHL (A*02:01)



Peptidă detectată pe

1 linie celulară de cancer renal, 0 țesuturi normale, 13 țesuturi canceroase (8 cancere renale, 1 cancer hepatic, 2 cancere pulmonare, 2 cancere rectale) (de la stânga la dreapta)

Figura 1D - Peptidă: RLHDENILL (A*02:01)



Peptidă detectată pe

1 linie celulară de cancer renal, 1 linie celulară de cancer de prostată, 1 linie celulară de melanom, 0 țesuturi normale, 50 de țesuturi canceroase (4 cancere cerebrale, 1 cancer de colon, 2 cancere esofagiene, 3 cancere renale, 2 cancere hepatice, 23 cancere pulmonare, 7 cancere ovariene, 2 cancere pancreatice, 2 cancere de prostată, 3 cancere rectale, 1 cancer gastric) (de la stânga la dreapta)

Peptide: SVLEKEIYSI (A*02:01)

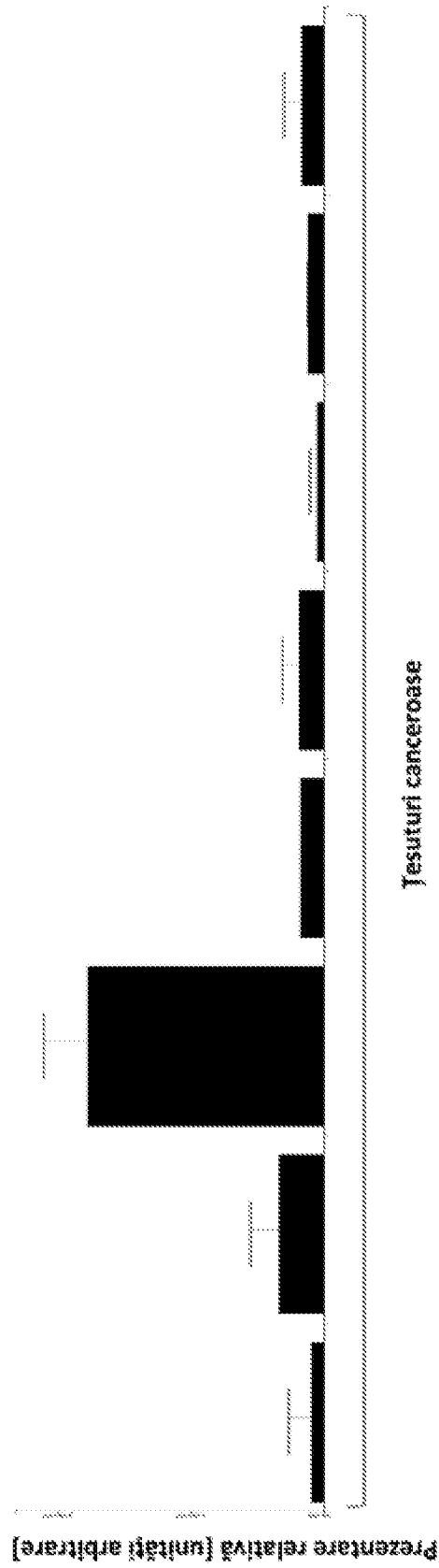
The chart displays the relative representation of 18 proteins (p0 to p17) in two groups: 'Linii Testuturi celule normale' (Normal Cell Lines) and 'Testuturi canceroase' (Cancerous Tissues). The y-axis represents 'Prezentare relativă (unități arbitrare)' from 0 to 7. The x-axis lists the proteins. The chart is divided into two sections by a vertical line. The left section shows the representation in normal cells, and the right section shows the representation in cancerous tissues. The bars are color-coded: black for p0-p17, grey for p18-p20, and white for p21-p23. The data shows that p0, p1, p2, p3, p4, p5, p6, p7, p8, p9, p10, p11, p12, p13, p14, p15, p16, p17, p18, p19, p20, p21, p22, p23, p24, p25, p26, p27, p28, p29, p30, p31, p32, p33, p34, p35, p36, p37, p38, p39, p40, p41, p42, p43, p44, p45, p46, p47, p48, p49, p50, p51, p52, p53, p54, p55, p56, p57, p58, p59, p60, p61, p62, p63, p64, p65, p66, p67, p68, p69, p70, p71, p72, p73, p74, p75, p76, p77, p78, p79, p80, p81, p82, p83, p84, p85, p86, p87, p88, p89, p90, p91, p92, p93, p94, p95, p96, p97, p98, p99, p100, p101, p102, p103, p104, p105, p106, p107, p108, p109, p110, p111, p112, p113, p114, p115, p116, p117, p118, p119, p120, p121, p122, p123, p124, p125, p126, p127, p128, p129, p130, p131, p132, p133, p134, p135, p136, p137, p138, p139, p140, p141, p142, p143, p144, p145, p146, p147, p148, p149, p150, p151, p152, p153, p154, p155, p156, p157, p158, p159, p160, p161, p162, p163, p164, p165, p166, p167, p168, p169, p170, p171, p172, p173, p174, p175, p176, p177, p178, p179, p180, p181, p182, p183, p184, p185, p186, p187, p188, p189, p190, p191, p192, p193, p194, p195, p196, p197, p198, p199, p200, p201, p202, p203, p204, p205, p206, p207, p208, p209, p210, p211, p212, p213, p214, p215, p216, p217, p218, p219, p220, p221, p222, p223, p224, p225, p226, p227, p228, p229, p230, p231, p232, p233, p234, p235, p236, p237, p238, p239, p240, p241, p242, p243, p244, p245, p246, p247, p248, p249, p250, p251, p252, p253, p254, p255, p256, p257, p258, p259, p260, p261, p262, p263, p264, p265, p266, p267, p268, p269, p270, p271, p272, p273, p274, p275, p276, p277, p278, p279, p280, p281, p282, p283, p284, p285, p286, p287, p288, p289, p290, p291, p292, p293, p294, p295, p296, p297, p298, p299, p300, p301, p302, p303, p304, p305, p306, p307, p308, p309, p310, p311, p312, p313, p314, p315, p316, p317, p318, p319, p320, p321, p322, p323, p324, p325, p326, p327, p328, p329, p330, p331, p332, p333, p334, p335, p336, p337, p338, p339, p340, p341, p342, p343, p344, p345, p346, p347, p348, p349, p350, p351, p352, p353, p354, p355, p356, p357, p358, p359, p360, p361, p362, p363, p364, p365, p366, p367, p368, p369, p370, p371, p372, p373, p374, p375, p376, p377, p378, p379, p380, p381, p382, p383, p384, p385, p386, p387, p388, p389, p390, p391, p392, p393, p394, p395, p396, p397, p398, p399, p400, p401, p402, p403, p404, p405, p406, p407, p408, p409, p410, p411, p412, p413, p414, p415, p416, p417, p418, p419, p420, p421, p422, p423, p424, p425, p426, p427, p428, p429, p430, p431, p432, p433, p434, p435, p436, p437, p438, p439, p440, p441, p442, p443, p444, p445, p446, p447, p448, p449, p450, p451, p452, p453, p454, p455, p456, p457, p458, p459, p460, p461, p462, p463, p464, p465, p466, p467, p468, p469, p470, p471, p472, p473, p474, p475, p476, p477, p478, p479, p480, p481, p482, p483, p484, p485, p486, p487, p488, p489, p490, p491, p492, p493, p494, p495, p496, p497, p498, p499, p500, p501, p502, p503, p504, p505, p506, p507, p508, p509, p510, p511, p512, p513, p514, p515, p516, p517, p518, p519, p520, p521, p522, p523, p524, p525, p526, p527, p528, p529, p530, p531, p532, p533, p534, p535, p536, p537, p538, p539, p540, p541, p542, p543, p544, p545, p546, p547, p548, p549, p550, p551, p552, p553, p554, p555, p556, p557, p558, p559, p560, p561, p562, p563, p564, p565, p566, p567, p568, p569, p570, p571, p572, p573, p574, p575, p576, p577, p578, p579, p580, p581, p582, p583, p584, p585, p586, p587, p588, p589, p590, p591, p592, p593, p594, p595, p596, p597, p598, p599, p600, p601, p602, p603, p604, p605, p606, p607, p608, p609, p610, p611, p612, p613, p614, p615, p616, p617, p618, p619, p620, p621, p622, p623, p624, p625, p626, p627, p628, p629, p630, p631, p632, p633, p634, p635, p636, p637, p638, p639, p640, p641, p642, p643, p644, p645, p646, p647, p648, p649, p650, p651, p652, p653, p654, p655, p656, p657, p658, p659, p660, p661, p662, p663, p664, p665, p666, p667, p668, p669, p670, p671, p672, p673, p674, p675, p676, p677, p678, p679, p680, p681, p682, p683, p684, p685, p686, p687, p688, p689, p690, p691, p692, p693, p694, p695, p696, p697, p698, p699, p700, p701, p702, p703, p704, p705, p706, p707, p708, p709, p710, p711, p712, p713, p714, p715, p716, p717, p718, p719, p720, p721, p722, p723, p724, p725, p726, p727, p728, p729, p730, p731, p732, p733, p734, p735, p736, p737, p738, p739, p740, p741, p742, p743, p744, p745, p746, p747, p748, p749, p750, p751, p752, p753, p754, p755, p756, p757, p758, p759, p760, p761, p762, p763, p764, p765, p766, p767, p768, p769, p770, p771, p772, p773, p774, p775, p776, p777, p778, p77

4 linii celulare (3 celule sanguine, 1 pancreas, 2 țesuturi normale (1 ganglion limfatic, 1 trahee), 52 de țesuturi canceroase (2 cancere de canal biliar, 1 cancer de celule mioeloide, 3 cancere de leucemie leucocitară, 5 cancere de glandă mamară, 1 cancer esofagian, 1 cancer de esofag și stomac, 1 cancer de vezică biliară, 4 cancere de colon, 7 cancere pulmonare, 6 cancere de ganglioni limfatici, 7 cancere ovariene, 4 cancere de prostată, 4 cancere de piele, 2 cancere de vezică urinară, 4 cancere de uter) (de la stânga la dreapta)

Figura 1

Peptidá: KIWEELSVLEV (A*02:01)

SEQ ID: 40

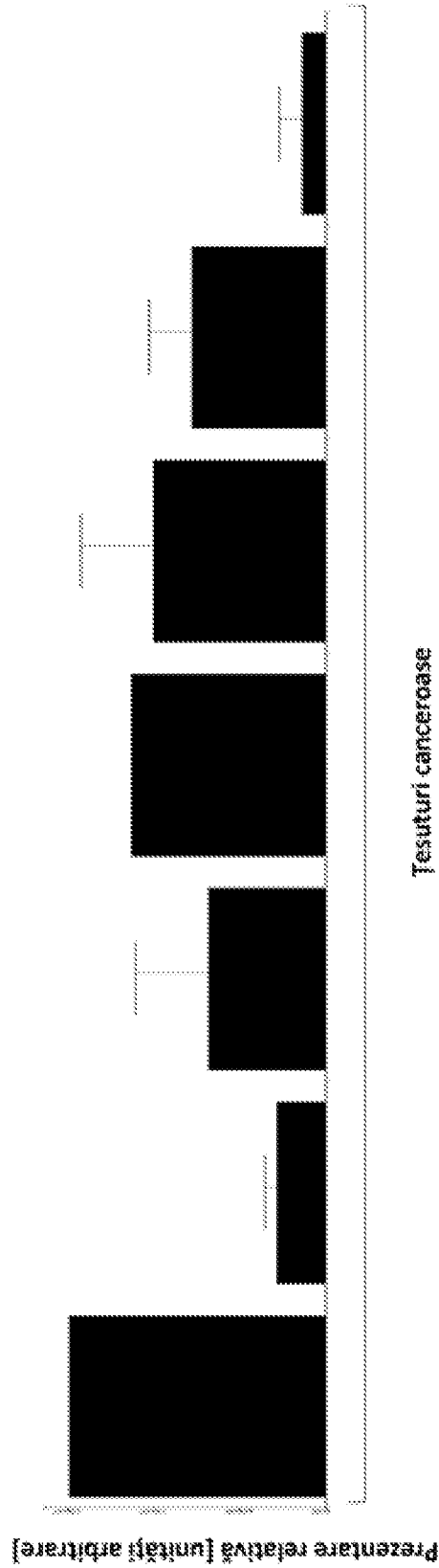


peptidă detectată pe
8 țesuturi canceroase (1 cancer hepatic, 3 cancere pulmonare, 2 cancere de piele, 1 cancer de stomac, 1 cancer de vezică
urinară) (de la stânga la dreapta)

GT 2024

Pepidä: FIENLLAA (A*02:01)

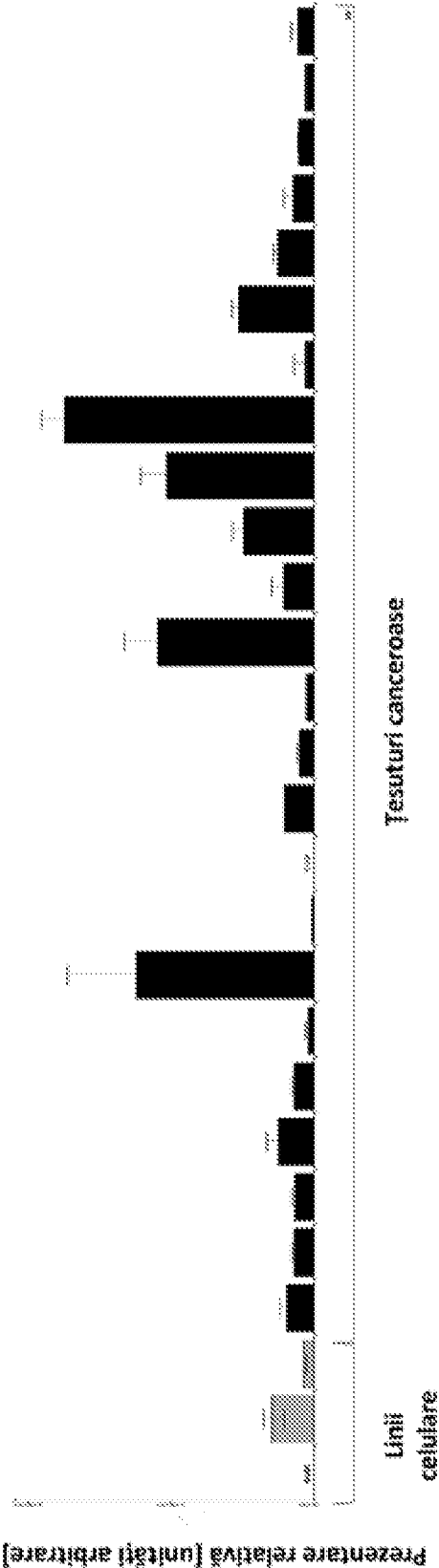
SEQ ID: 67



Peptidă detectată pe
7 tesuturi canceroase (4 cancere cerebrale, 2 cancere pulmonare, 1 cancer uterin) (de la stânga la dreapta)

Figura 1H

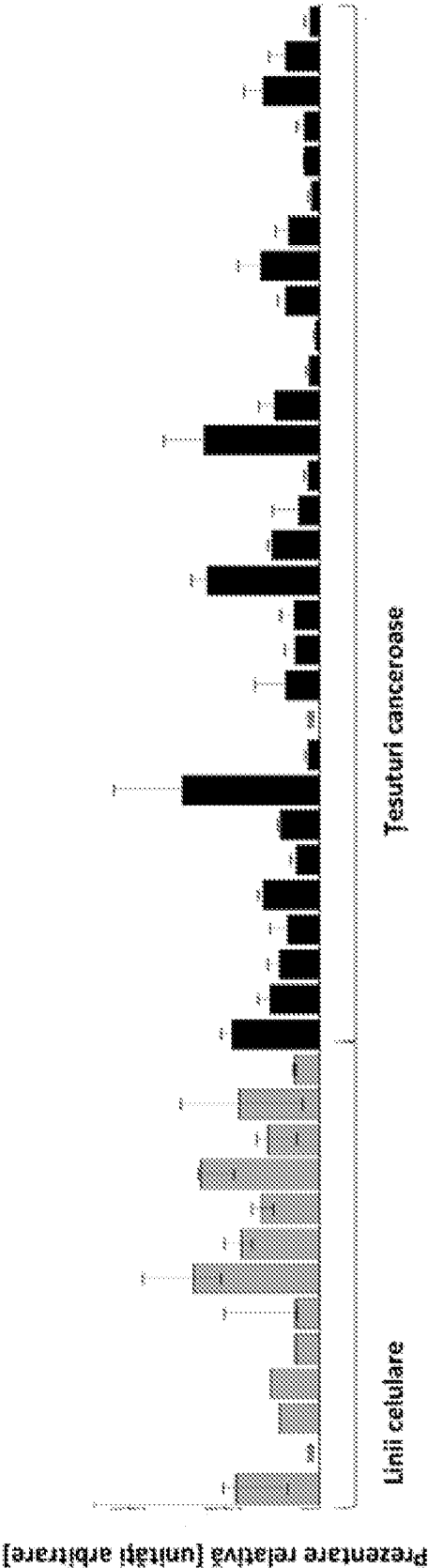
Peptidă: FLLEREQLL (A*02:01)
SEQ ID: 84



Peptidă detectată pe
3 linii celulare (2 celule sanguine, 1 piele), 24 de țesuturi canceroase (1 cancer de celule mieloide, 3 cancere de leucemie leucocitară, 1 cancer de măduvă osoasă, 1 cancer de glandă mamară, 1 cancer renal, 2 cancere de colon, 3 cancere rectale, 1 cancer pulmonar, 7 cancere de ganglioni limfatici, 3 cancere de vezică urinară, 1 cancer uterin) (de la stânga la dreapta)

Figura 11

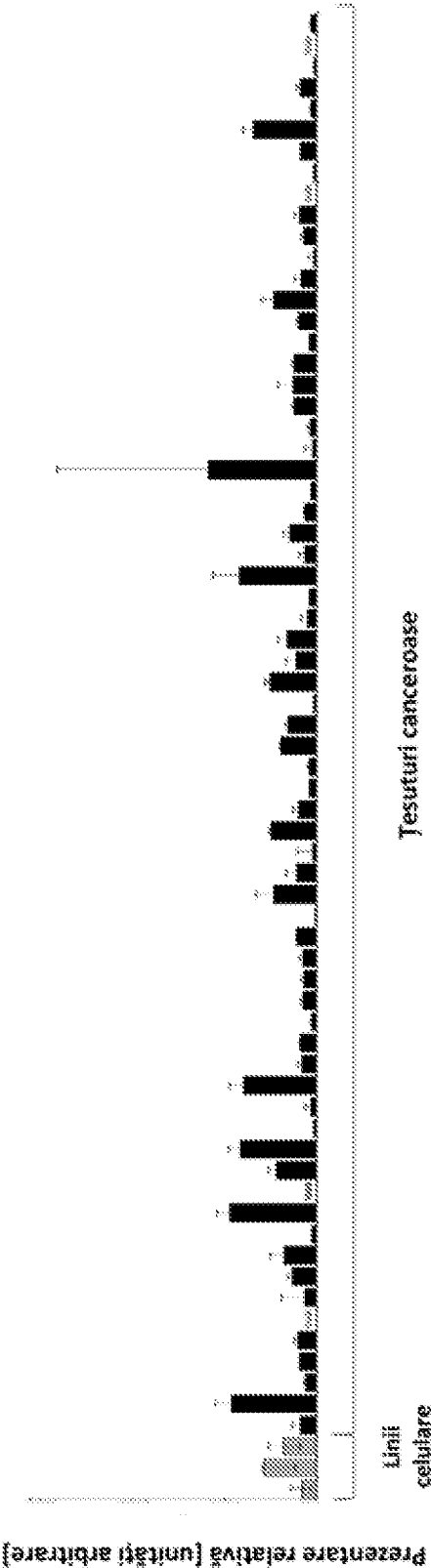
Peptidă: SLLNQPKAV (A*02:01)
SEQ ID: 235



Peptidă detectată pe
13 linii celulare (3 celule sanguine, 2 rinichi, 8 pancreas), 30 de țesuturi canceroase (1 cancer de celule mieloide, 1 cancer de leucemie leucocitară, 2 cancere cerebrale, 2 cancere de glandă mamară, 2 cancere esofagiene, 1 cancer de vezică biliară, 1 cancer rectal, 1 cancer pulmonar, 2 cancere hepatice, 5 cancere de ganglioni limfatici, 2 cancere ovariene, 2 cancere de piele, 4 cancere de vezică urinară, 1 cancer uterin) (de la stânga la dreapta)

Figura 1J

Peptidă: GLAEFQENV (A*02:01)
SEQ ID: 243



Peptidă detectată pe

3 linii celulare (1 celule sanguine, 1 rinichi, 1 pancreas), 67 de țesuturi canceroase (1 cancer de canal biliar, 4 cancere de leucemie leucocitară, 1 cancer de celule mieloid, 2 cancere cerebrale, 3 cancere de glandă mamară, 4 cancere esofagiene, 2 cancere de vezică biliară, 2 cancere de colon, 1 cancer rectal, 2 cancere hepatice, 15 cancere pulmonare, 8 cancere de ganglioni limfatici, 9 cancere ovariene, 3 cancere de piele, 4 cancere de vezică urinară, 6 cancere uterine) (de la stânga la dreapta)

Figura 2H

Gene: IGF2BP1, IGF2BP3
Peptidă: TLYNPERTIV
SEQ ID: 274

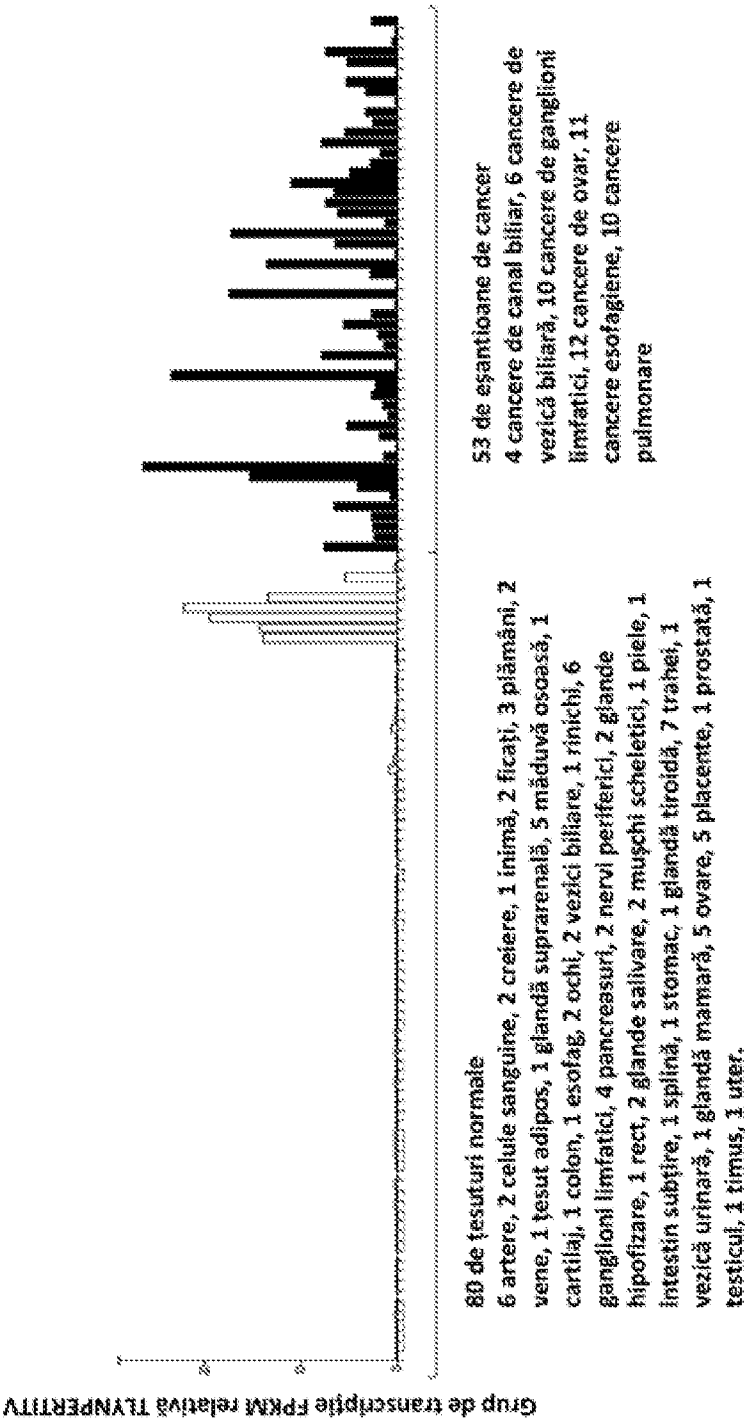


Figura 2A Genă: PRM12

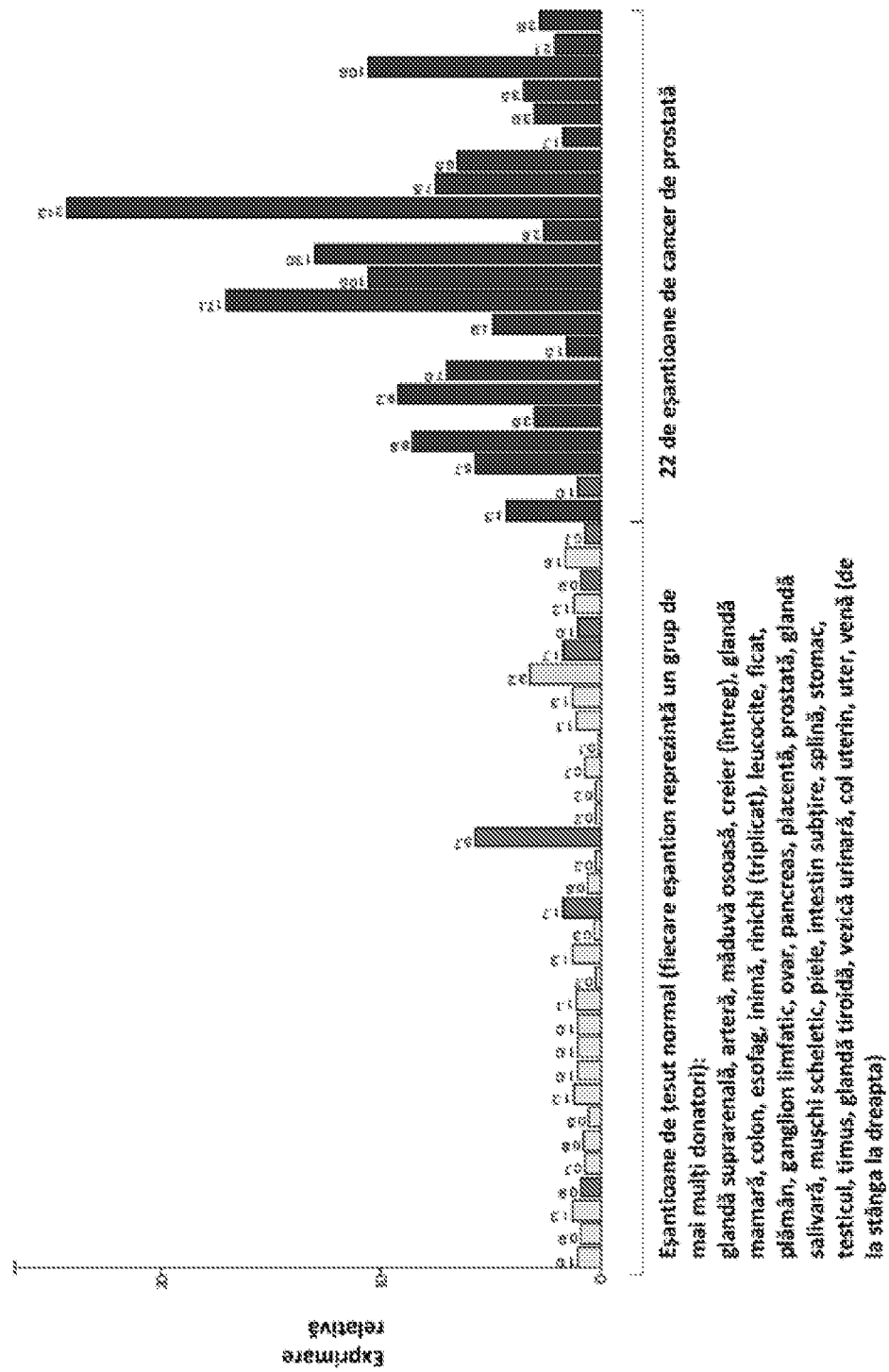


Figura 2B Genă: CHEK1

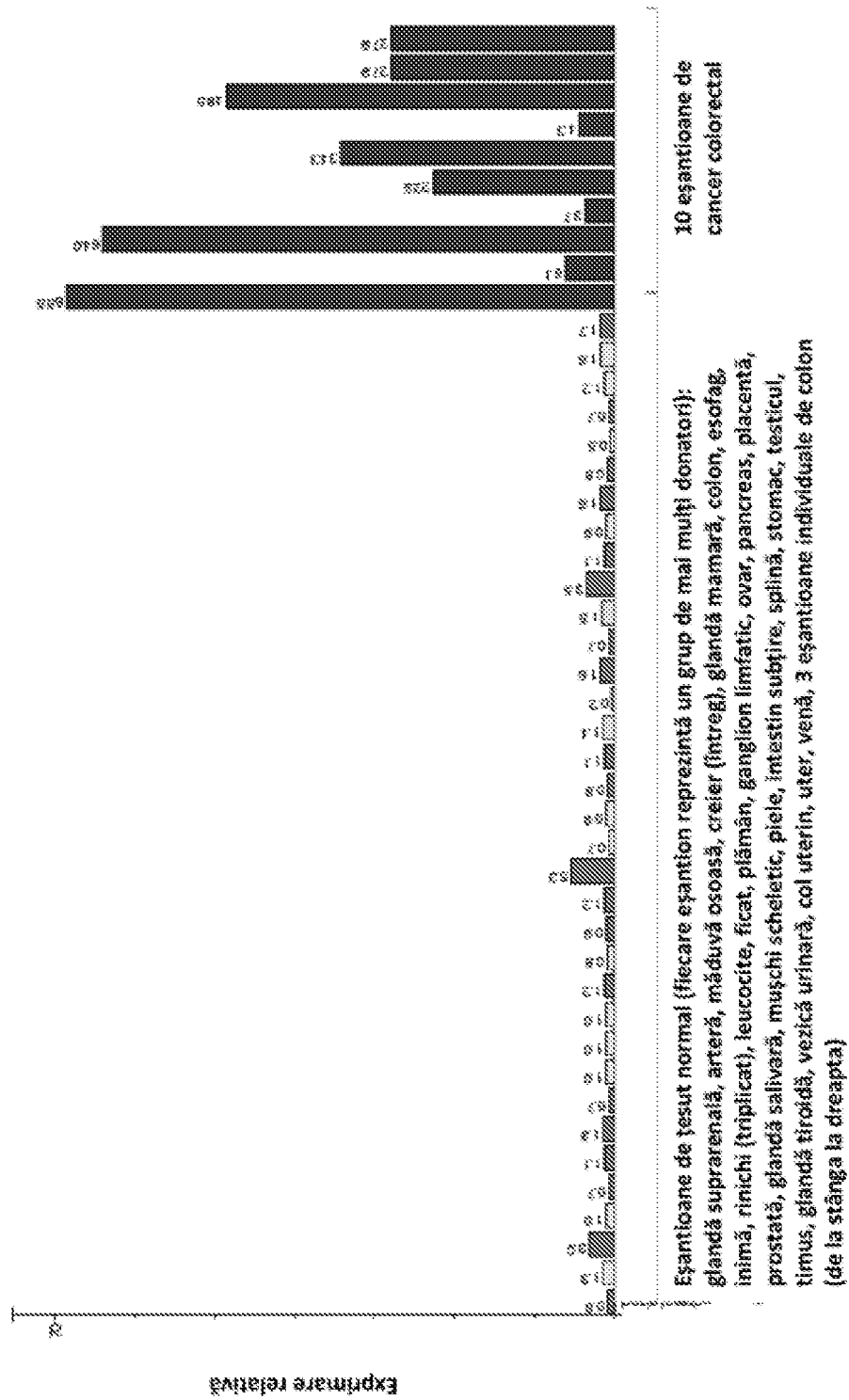


Figura 2C Genă: TTC30A

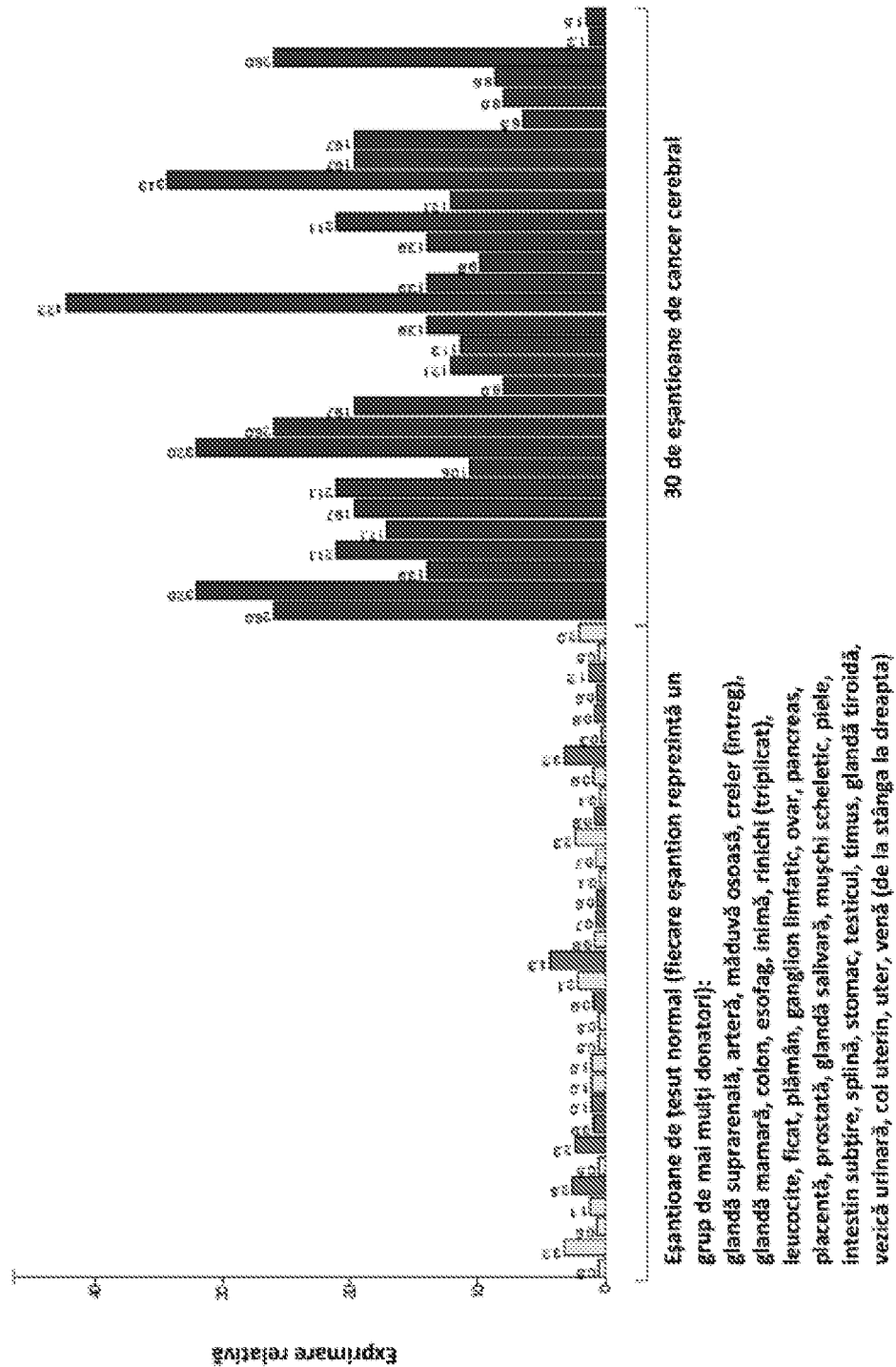


Figura 2D Genă: TRIP13

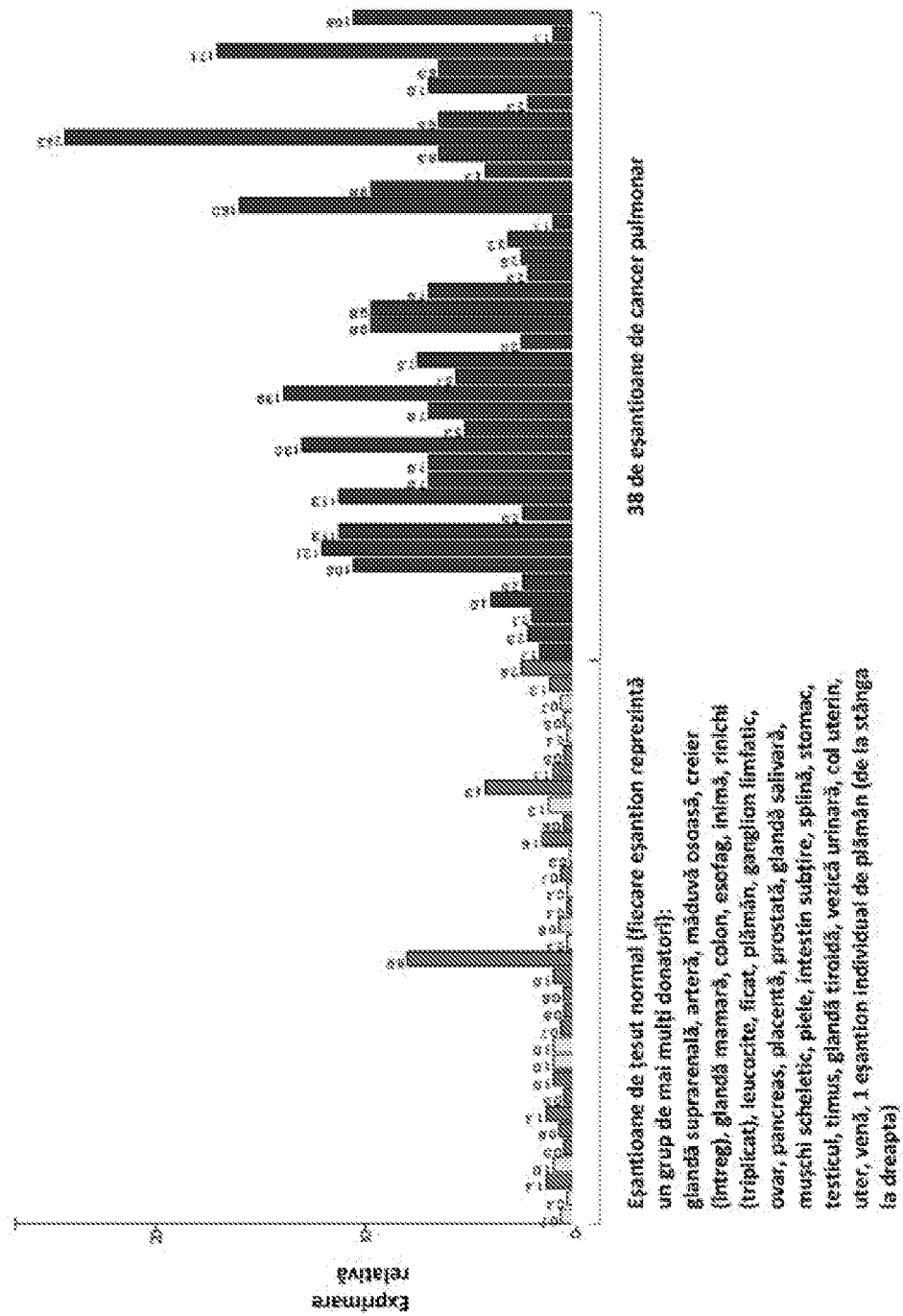


Figura 2E Genă: MXRA5

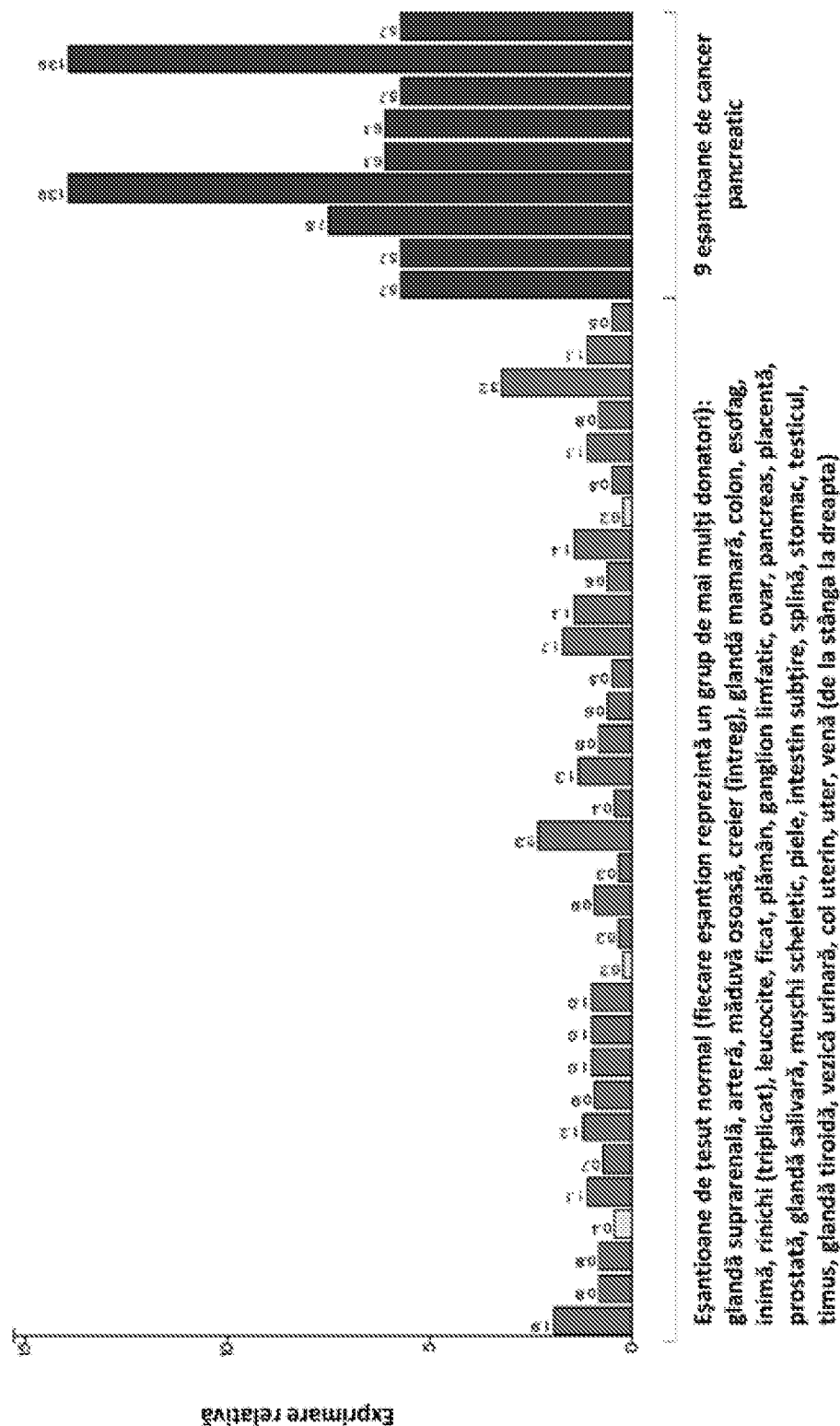


Figura 2F

Gene: MMP11, MMP13
Peptidă: KWSDDVTPL
SEQ ID: 24

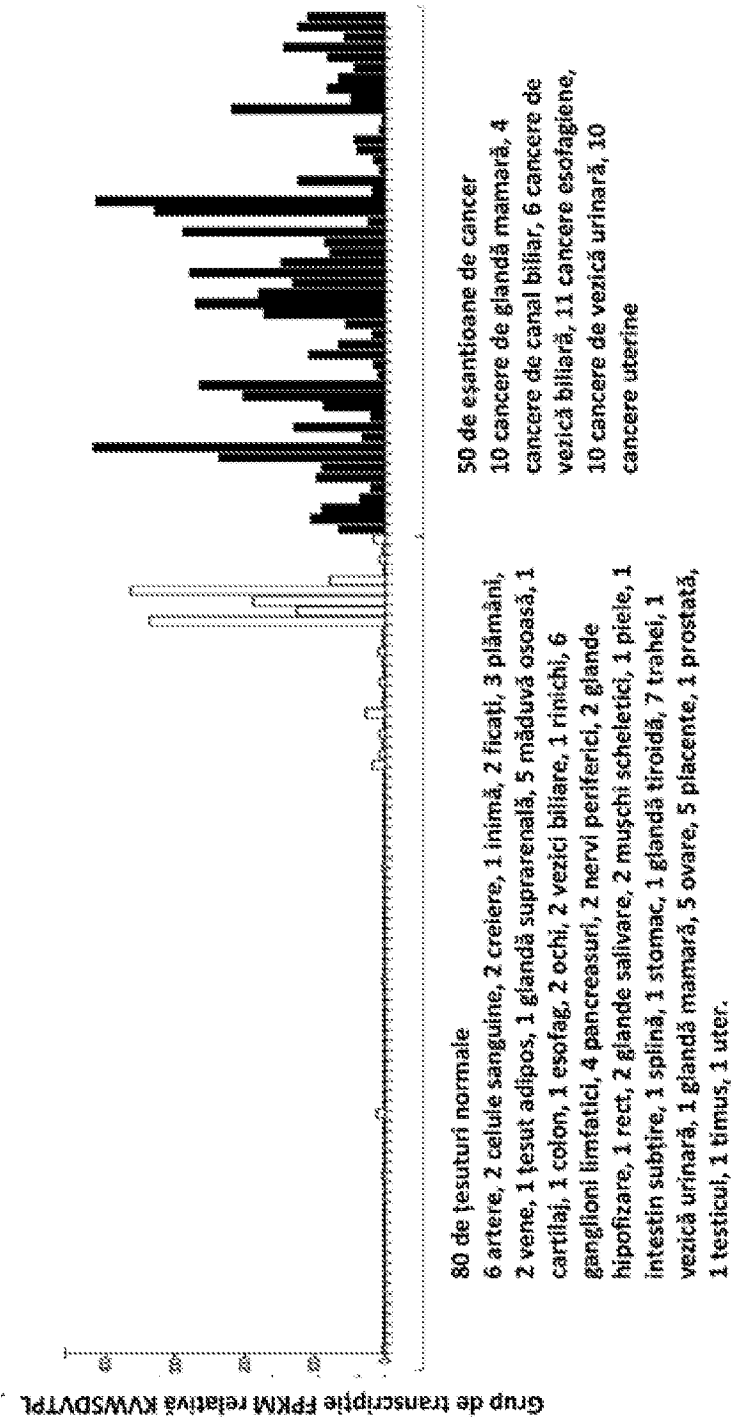


Figura 2G

Genă: **HORMAD1**
Peptidă: **VIFEGEPMYL**
SEQ ID: 168

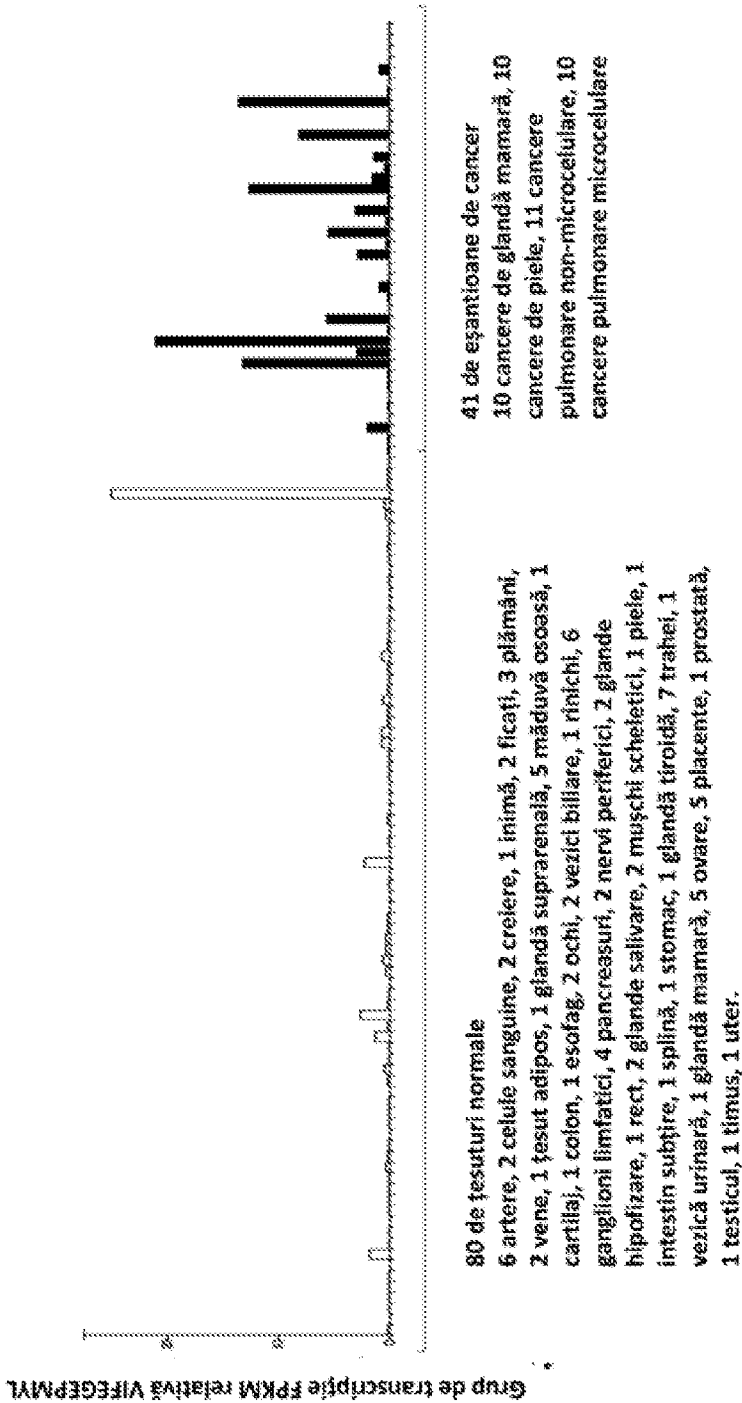
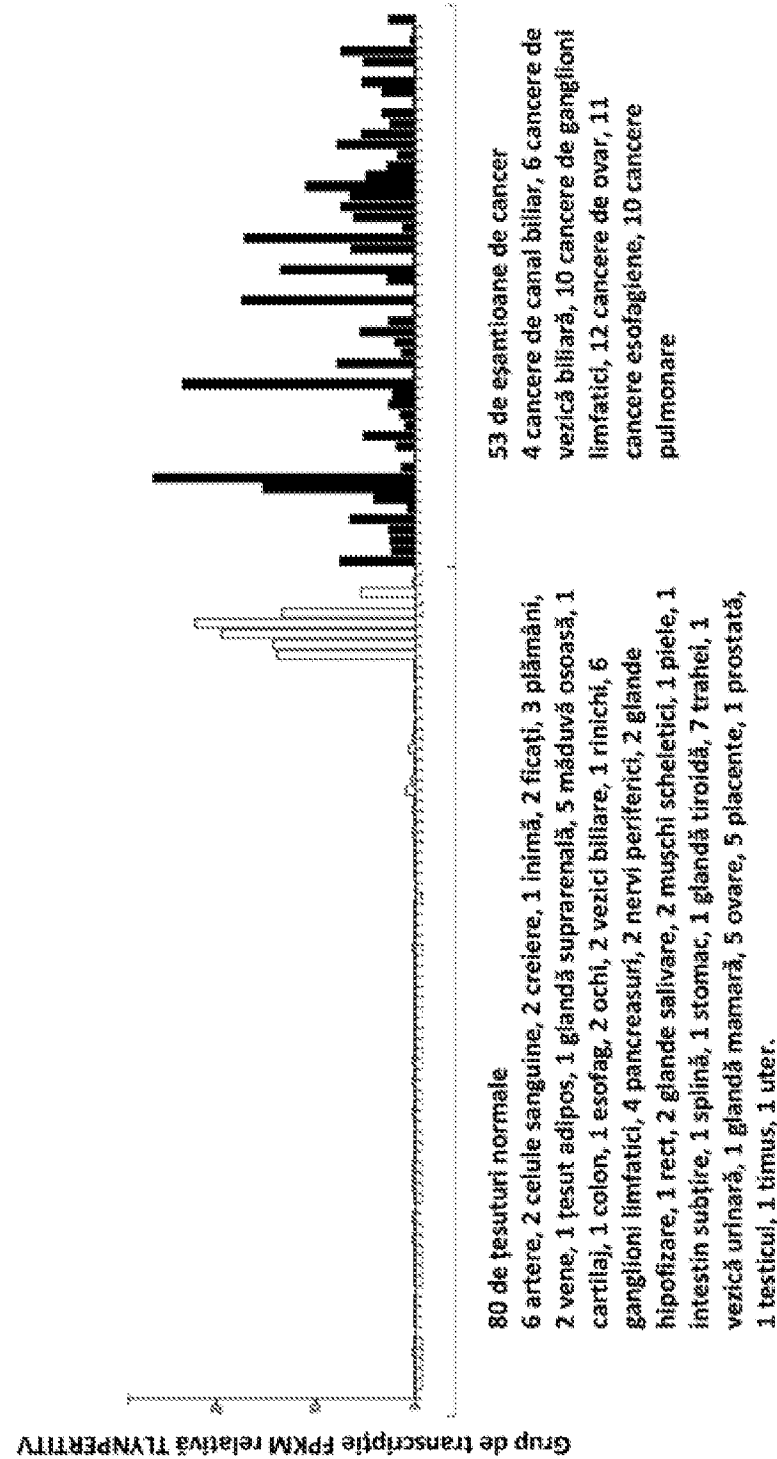
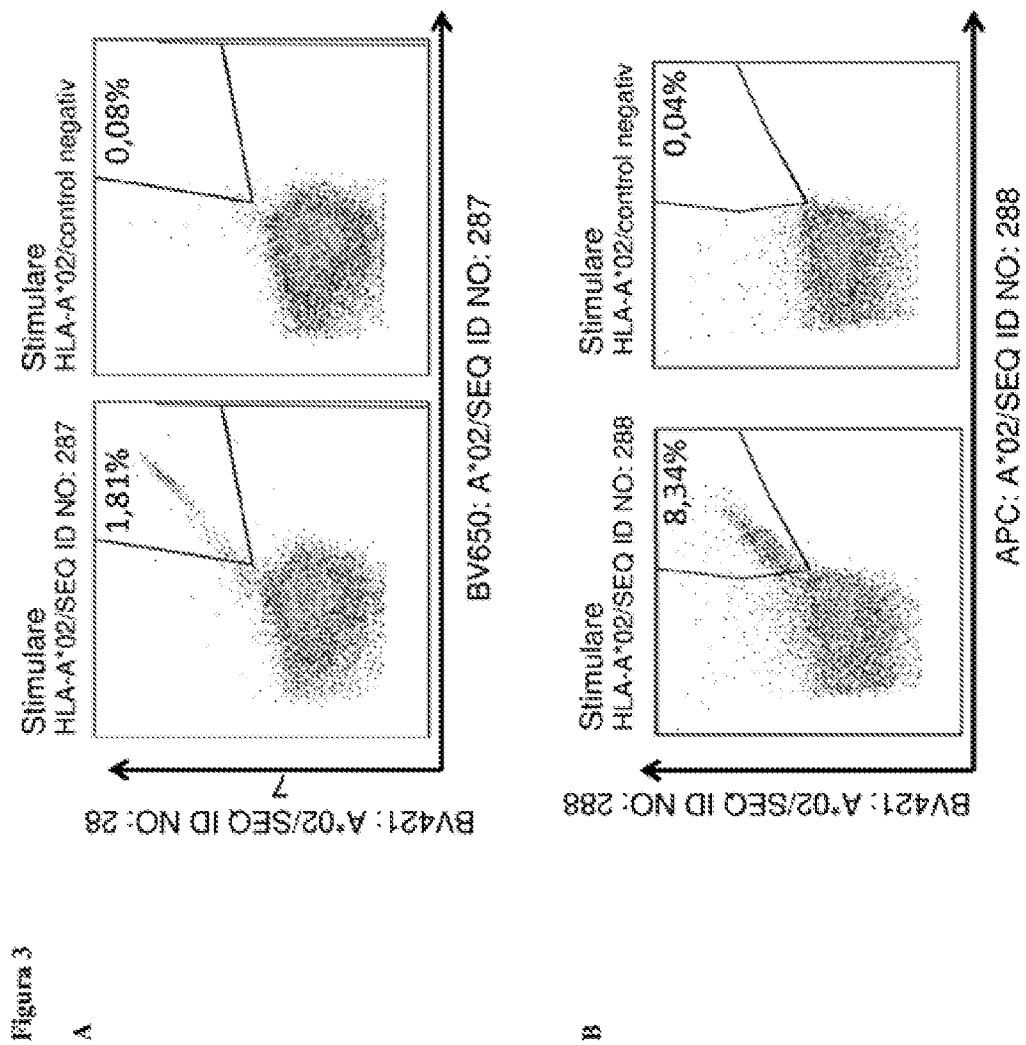


Figura 2H

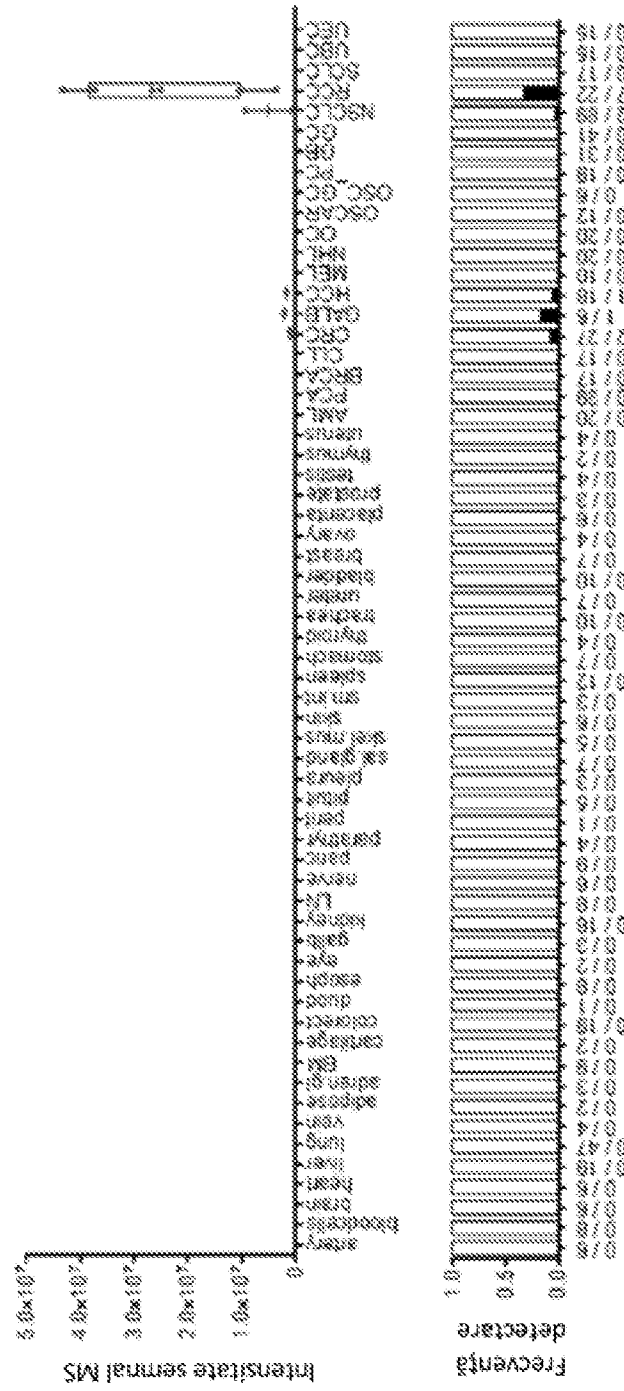
Gene: IGF2BP1, IGF2BP3
Peptidă: TLYNPERTITV
SEQ ID: 274





Page 4

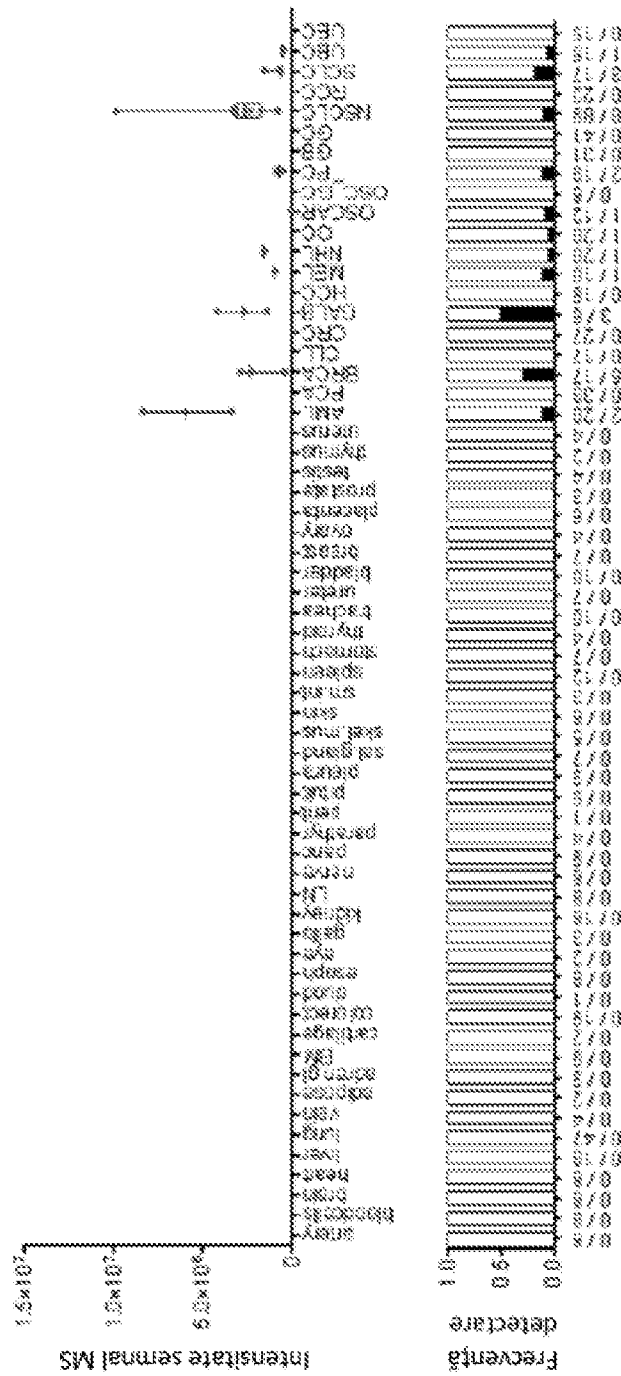
SEQ ID NO: 11: HAVCR1-001



Testuri (de la stânga la dreapta): Esantioane normale: arteră, celule sanguine, creier, inimă, ficat, plămân, venă, tesuturi adipose, glandă suprarenală, măduvă osoasă, colon și rect, duoden, esofag, vezică biliară, ganglion limfatic, pancreas, glandă paratiroidă, peritoneu, glandă pituitară, glandă salivară, mușchi scheletic, piele, Intestin subțire, splină, stomac, trahee, ureter, vezică urinară, glandă mamară, ovar, placenta, prostată, testicul, timus, uter. Esantioane tumorale: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALT, HCC, NHL, OC, OSCAR, OSC_GC, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

Figure 4C

SEQ ID NO: 21: COL6A3-015



Testaturi (de la stânga la dreapta): Exantioane normale: arteră, celule sanguine, creier, inimă, ficat, plămân, venă, țesuturi adipooe, glandă suprarenală, măduvă osoasă, colon și rect, duoden, esofag, vezică biliară, ganglion limfatic, pancreas, glandă paratiroidă, peritoneu, glandă pituitară, glandă salivară, mușchi scheletic, piele, intestin subțire, splină, stomac, tiroidă, trahee, ureter, vezică urinară, glandă mamară, ovar, placență, prostată, testicul, timus, uter. Exantioane tumorale: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, OSC_GC, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

Figura 4D
SEQ ID NO: 24: MMP-002

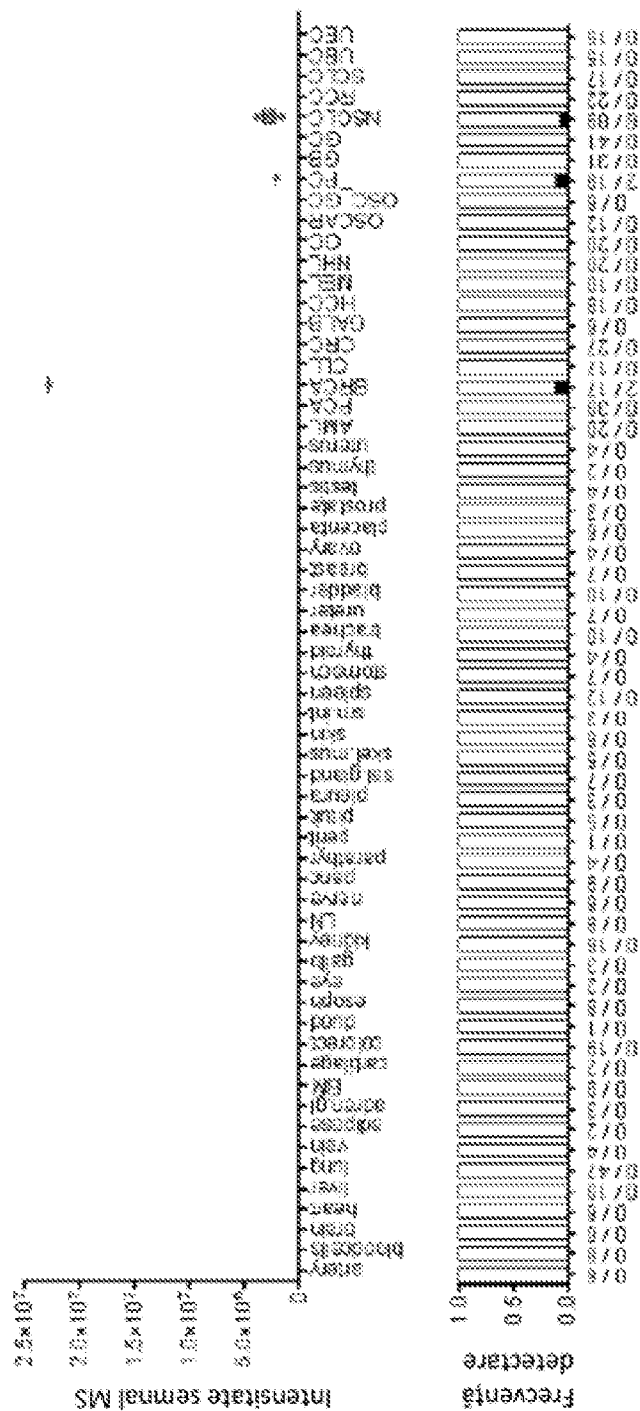
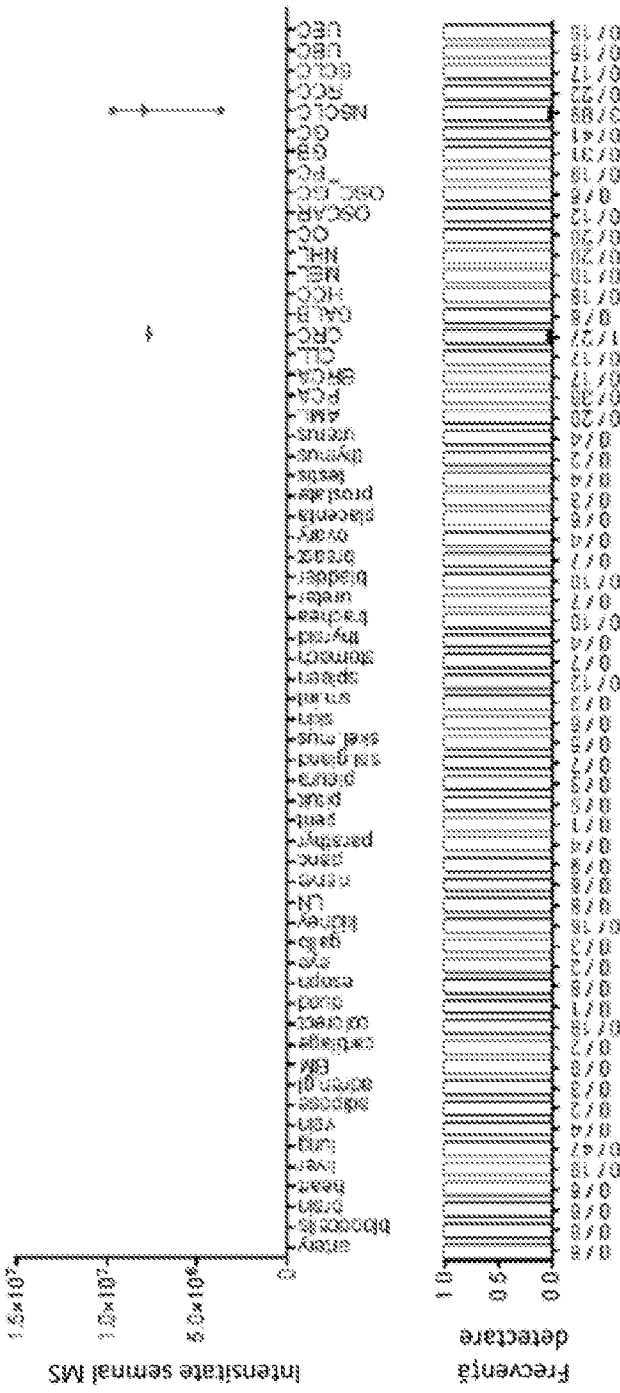


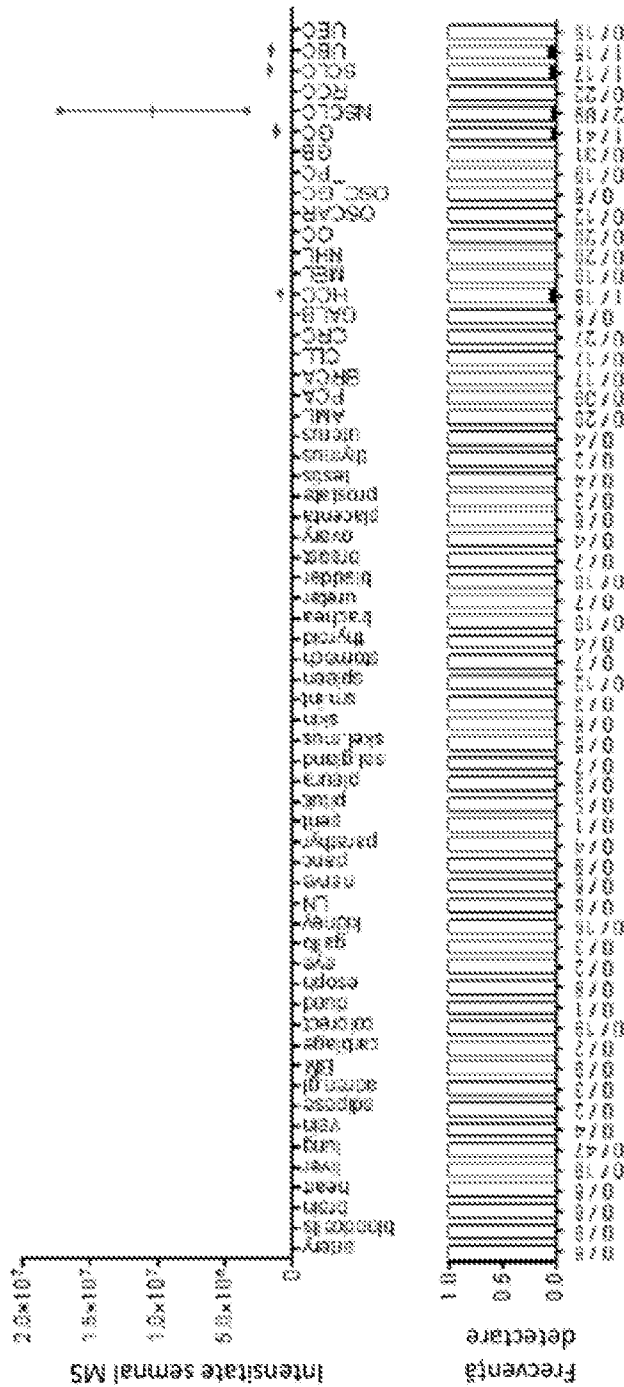
Figura 4E
SEQ ID NO: 25: MXRA5-003



Tesuturi (de la stînga la dreapta): Eșantioane normale: arteră, celule sanguine, creier, inimă, ficat, plămîn, venă, țesuturi adipose, glandă suprarenală, măduvă osoasă, colon și rect, duoden, esofag, vezică biliară, ganglion limfatic, pancreas, glandă paratiroidă, peritoneu, glandă pituitară, glandă salivară, mușchi scheletic, piele, intestin subțire, splină, stomac, tiroidă, trachee, ureter, vezică urinară, glandă mamară, ovar, placentă, prostată, testicul, tîmus, uter. Eșantioane tumorale: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, OSC_GC, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

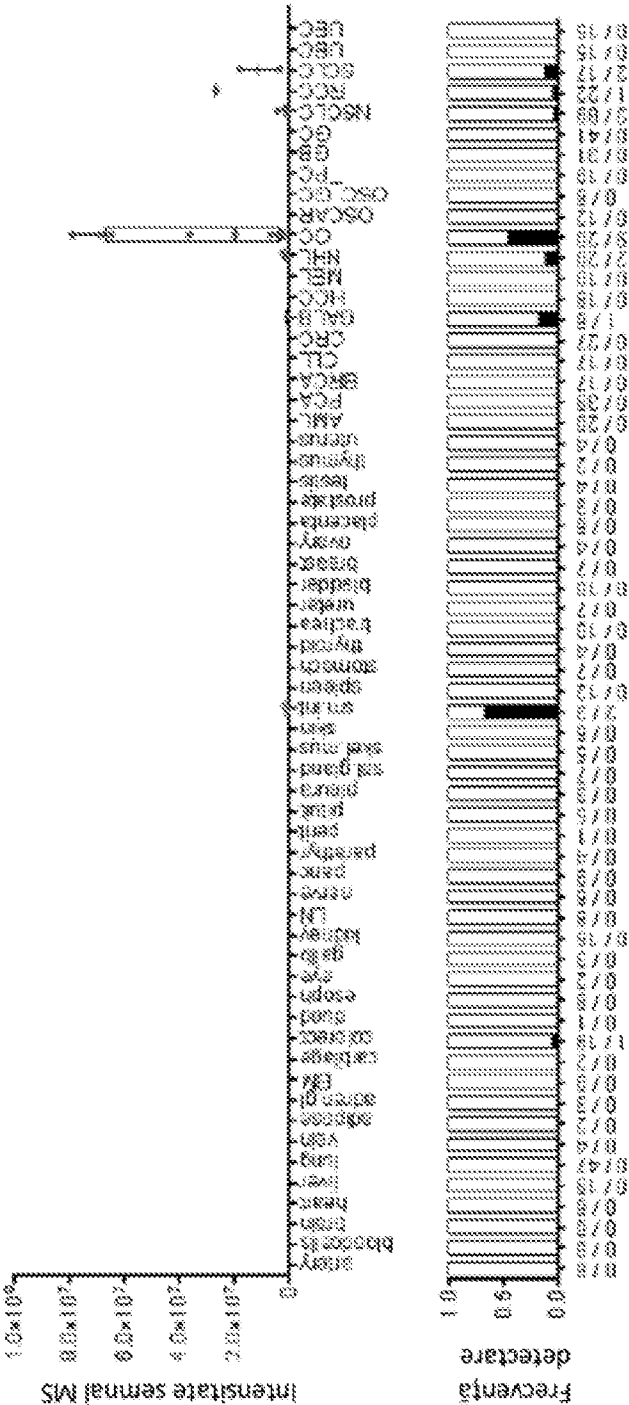
44 288514

SEQ ID NO: 40: MAGEA3-003



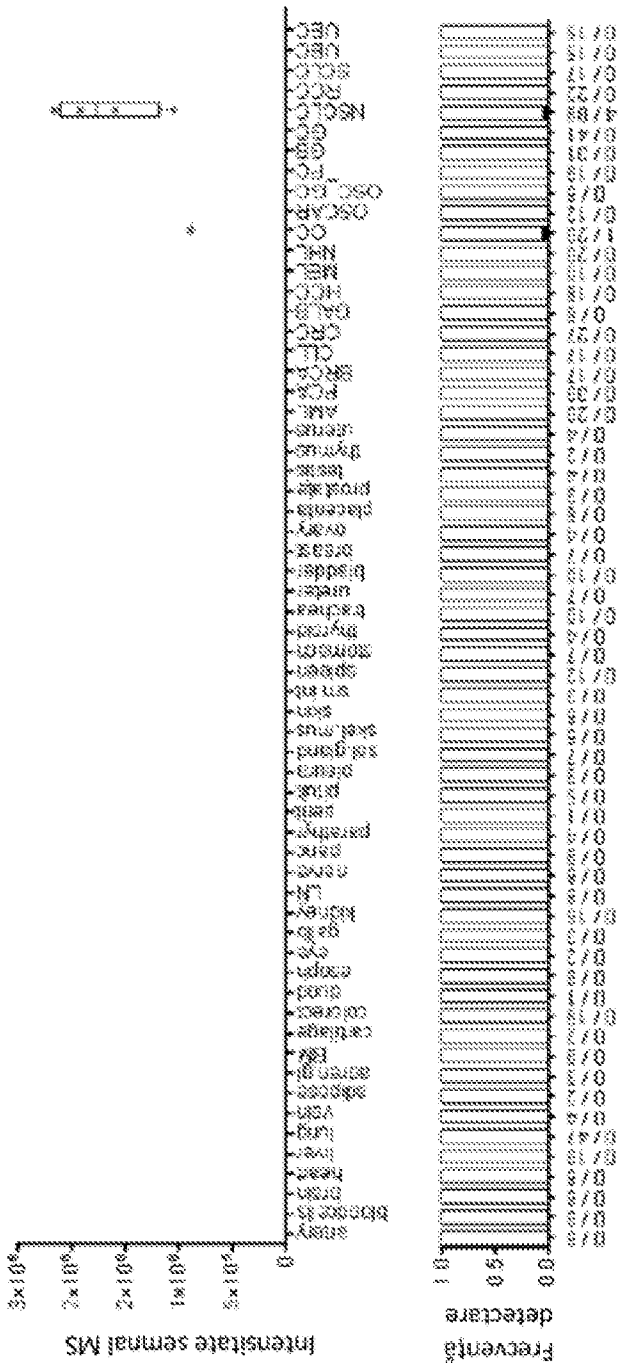
Țesuturi (de la stânga la dreapta): Esanțioane normale: arteră, celule sanguine, creier, inimă, ficat, plămân, venă, țesuturi adipozе, glandă suprarenală, măduvă osoasă, colon și rect, duoden, esofag, vezică biliară, ganglion limfatic, pancreas, glandă paratiroidă, peritoneu, glandă pituitară, glandă salivară, mușchi scheletic, piele, intestin subțire, splină, stomac, trahee, ureter, vezică urinară, glandă mamară, ovar, placenta, prostată, testicul, timus, uter. Esanțioane tumorale: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALT, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, OSC_GC, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

Figura 4H
SEQ ID NO: 89: HTR3A-001



Țesuturi (de la stânga la dreapta): Eșantioane normale: arteră, celule sanguine, creier, inimă, ficat, plămân, venă, țesuturi adipose, glandă suprarenală, măduvă osoasă, colon și rect, duoden, esofag, vezică biliară, ganglion limfatic, pancreas, glandă paratiroidă, peritoneu, glandă pituitară, glandă salivară, mușchi scheletic, piele, intestin subțire, splină, stomac, tiroidă, trahee, ureter, vezică urinară, glandă mamară, ovar, placenta, prostată, testicul, timus, uter. Eșantioane tumorale: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, OSC_GC, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

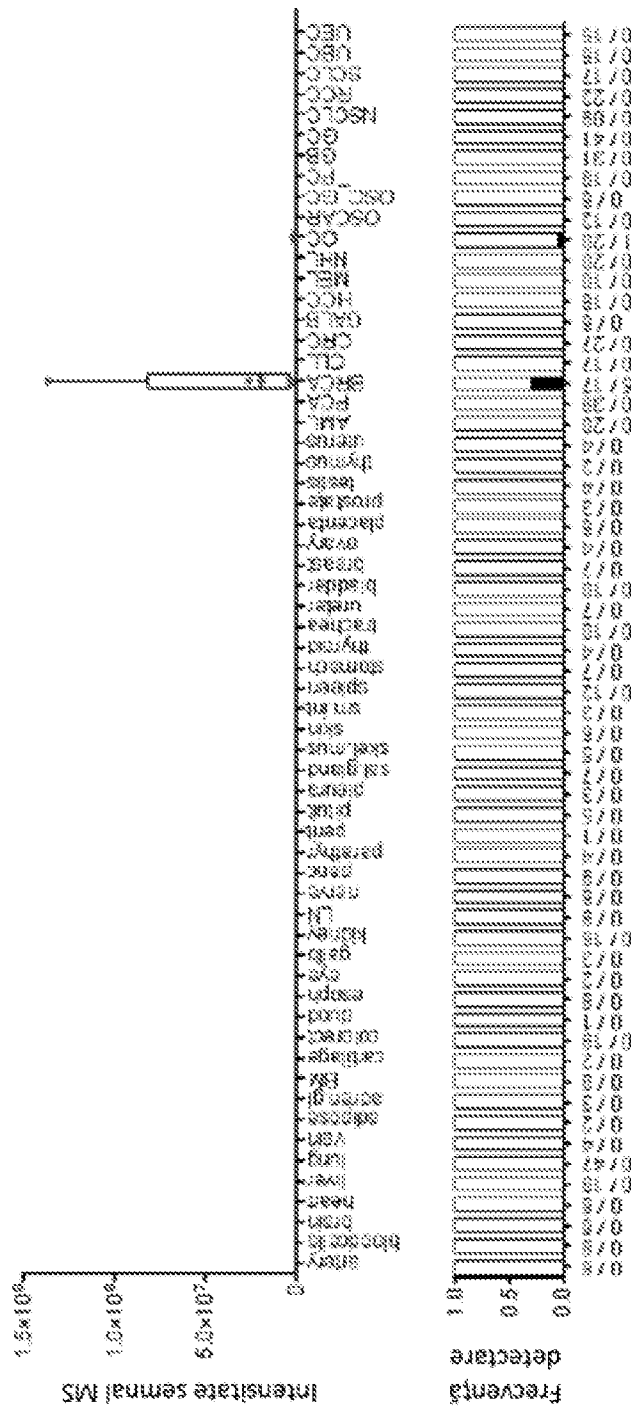
Figura 41
SEQ ID NO: 117: CABY-001



Tesuturi (de la stânga la dreapta): Esantioane normale: arteră, celule sanguine, creier, inimă, ficat, plămân, venă, tesuturi adipose, glandă suprarenală, măduvă osoasă, colon și rect, duoden, esofag, vezică biliară, ganglion limfatic, pancreas, glandă paratiroidă, peritoneu, glandă pituitară, glandă salivară, mușchi scheletic, piele, intestin subțire, splină, stomac, trahee, ureter, vezică urinară, glandă mamară, ovar, placenta, prostată, testicul, timus, uter. Esantioane tumorale: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, OSC_GC, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

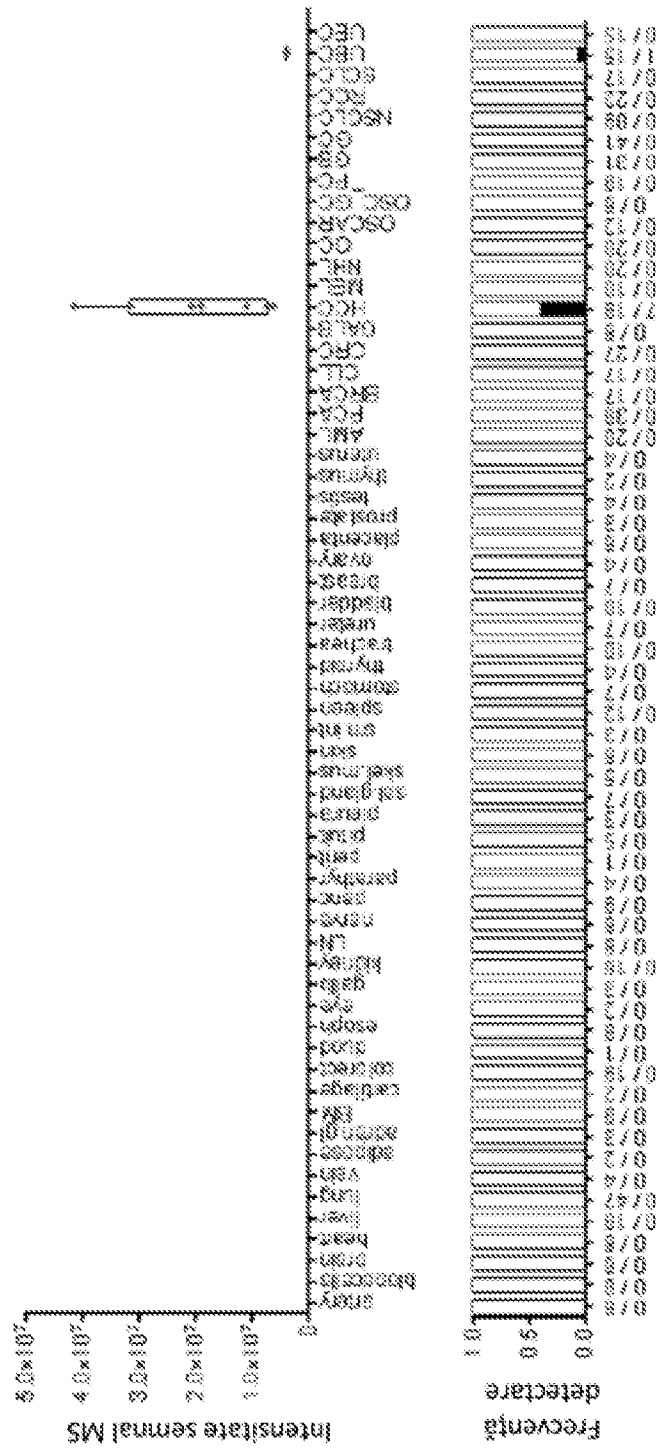
XI 192351.3

SEQ ID NO: 155: CYP4Z-001



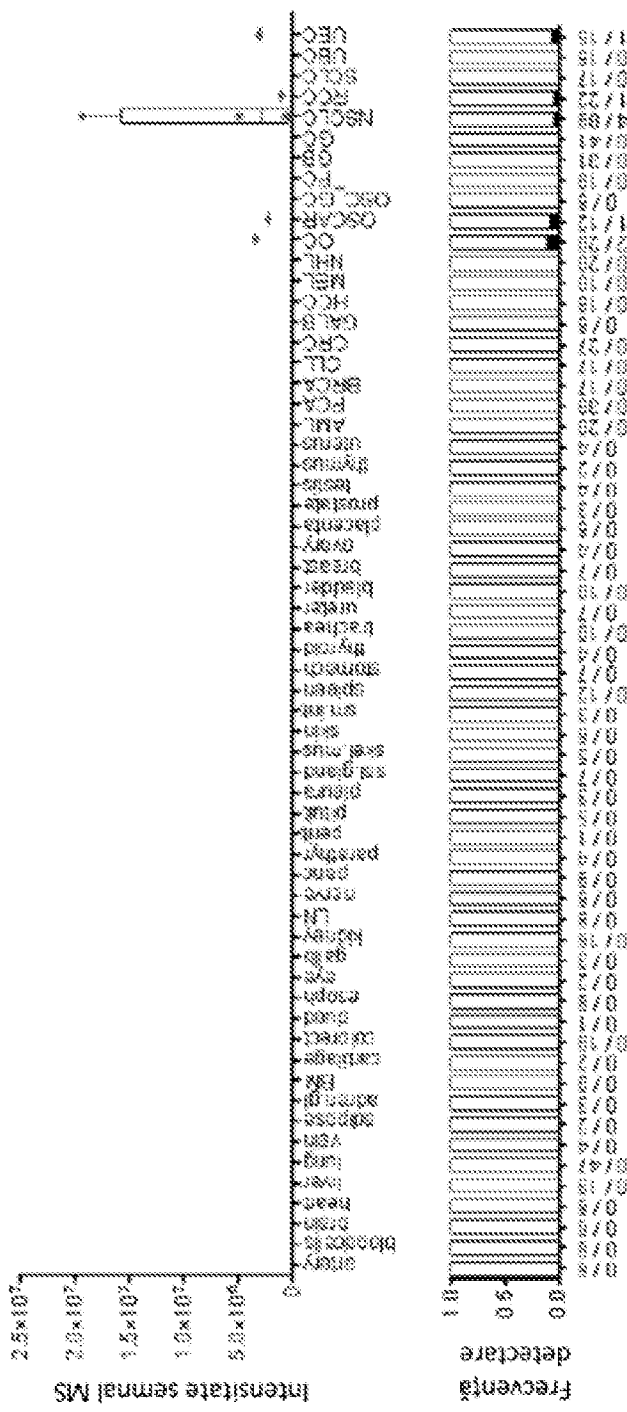
Testuri (de la stânga la dreapta): Eșantioane normale: arteră, celule sanguine, creier, inimă, ficat, plămân, venă, testuri adipoase, glandă suprarenală, măduvă osoasă, colon și rect, duoden, esofag, vezică biliară, ganglion limfatic, pancreas, glandă paratiroidă, peritoneu, glandă pituitară, glandă salivară, mușchi scheletic, piele, intestin subțire, splină, stomac, tiroidă, trahee, ureter, vezică urinară, glandă mamară, ovar, placenta, prostată, testicul, timus, uter. Eșantioane tumorale: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, OSC_GC, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

Figure 4L
SEQ ID NO: 157: DCAF4L2-001



Testaturi (de la stanga la dreapta): Esantioane normale: artera, celule sanguine, creier, inimă, ficat, plămân, venă, tesuturi adipozase, glandă suprarenală, măduvă osoasă, colon și rect, duoden, esofag, vezică biliară, ganglion limfatic, pancreas, glandă paratiroidă, peritoneu, glandă pituitară, glandă salivară, mușchi scheletic, piele, intestin subțire, splină, stomac, tiroidă, trahee, ureter, vezică urinară, glandă mamară, ovar, placenta, prostată, testicul, timus, uter. Esantioane tumorale: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, OSC GC, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

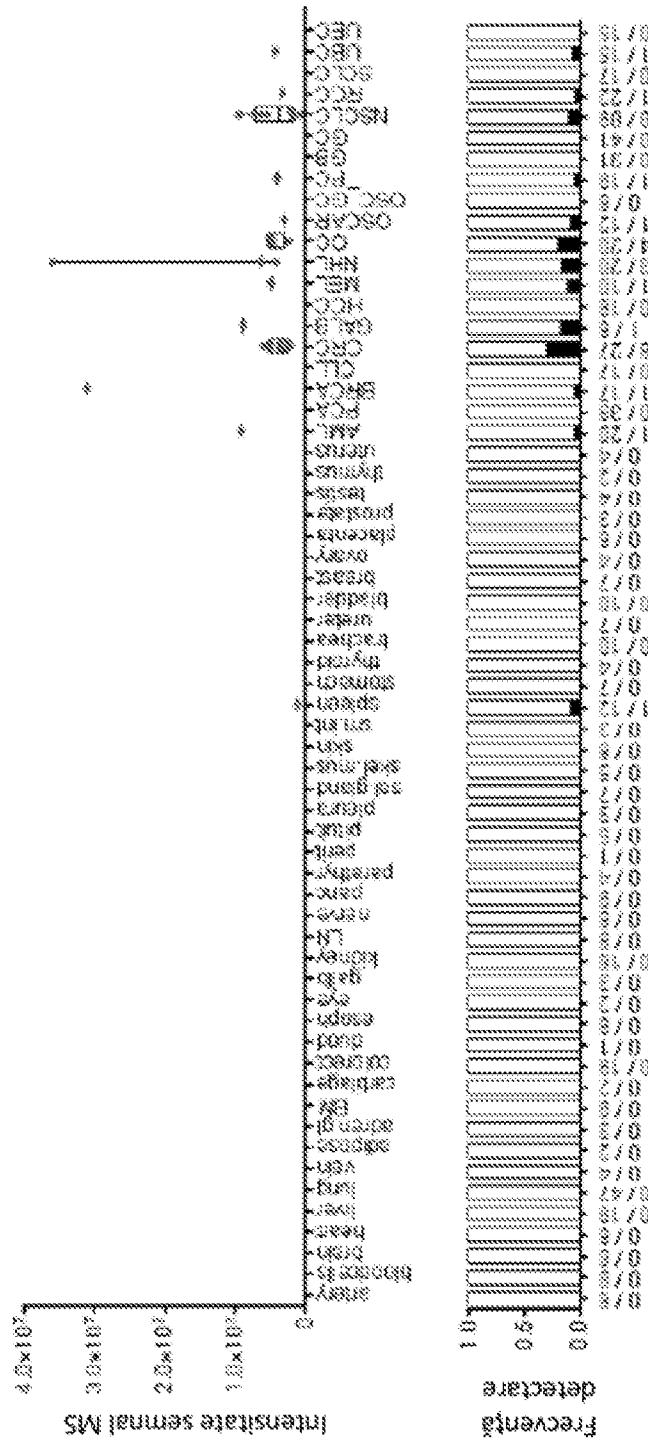
Figura 4N
SEQ ID NO: 233: ZFP42-001



Țesuturi (de la stânga la dreapta): Eșantioane normale: arteră, celule sanguine, creier, inimă, ficat, plămân, venă, țesuturi adipoz, glandă suprarenală, măduvă osoasă, colon și rect, duoden, esofag, vezică biliară, ganglion limfatic, pancreas, glandă paratiroidă, peritoneu, glandă pituitară, glandă salivară, mușchi scheletic, piele, intestin subțire, splină, stomac, tiroidă, trachee, ureter, vezică urinară, glandă mamară, ovar, placenta, prostată, testicul, timus, uter. Eșantioane tumorale: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, OSC_GC, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

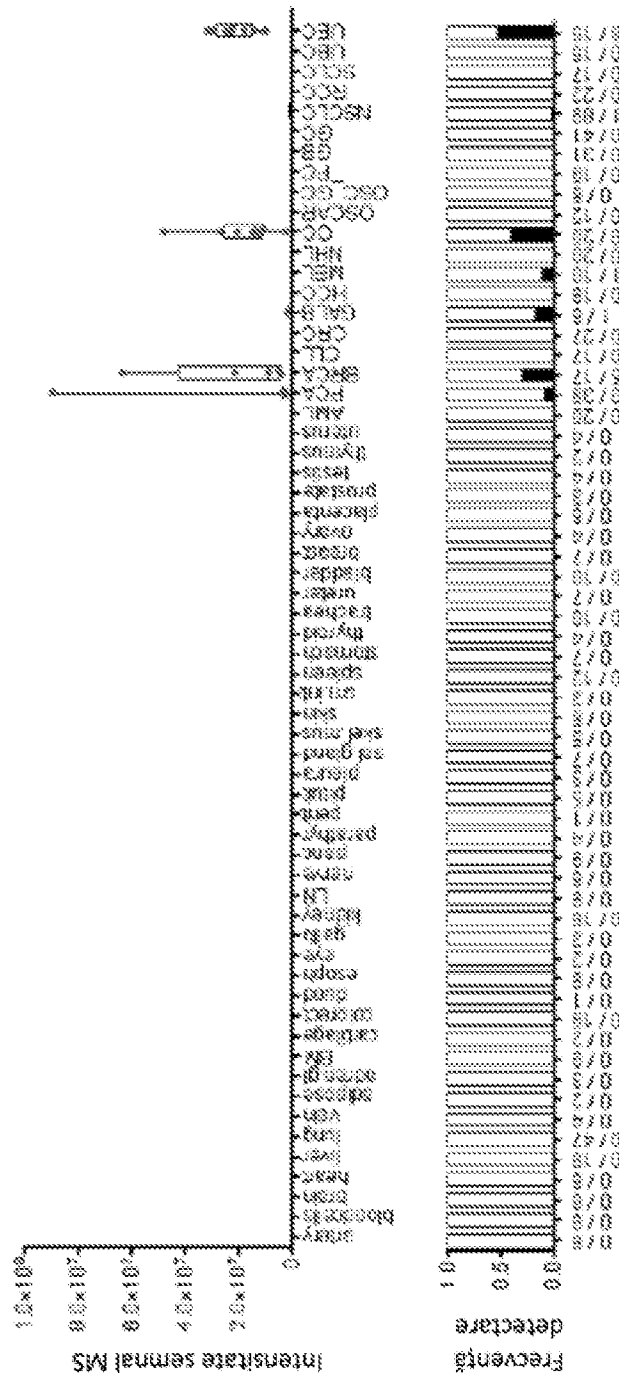
2000

SEQ ID NO: 253; RAD548-002



Testaturi (de la stanga la dreapta): Esantioane normale: artera, celule sanguine, creier, inimă, ficat, plămân, venă, tesuturi adipoose, glandă suprarenală, măduvă osoasă, colon și rect, duoden, esofag, vezică biliară, ganglion limfatic, pancreas, glandă paratiroidă, peritoneu, glandă pituitară, glandă salivară, mușchi scheletic, piele, intestin subțire, splină, stomac, tiroidă, trahee, ureter, vezică urinară, glandă mamară, ovar, placenta, prostată, testicul, timus, uter. Esantioane tumorale: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, OSC_GC, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

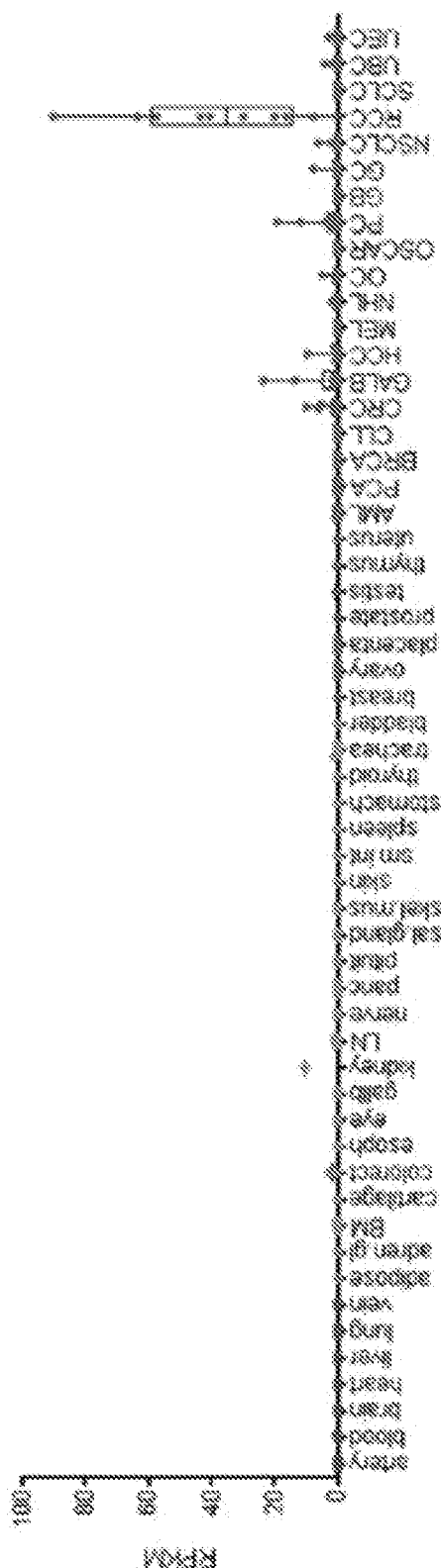
Figura 4Q
SEQ ID NO: 264: ESR1-001



Tesuturi (de la stânga la dreapta): Esantioane normale: arteră, celule sanguine, creier, inimă, ficat, plămân, venă, tesuturi adipose, glandă suprarenală, măduvă osoasă, colon și rect, duoden, esofag, vezică biliară, ganglion limfatic, pancreas, glandă paratiroidă, peritoneu, glandă pituitară, glandă salivară, mușchi scheletic, piele, intestin subțire, splină, stomac, trahee, ureter, vezică urinară, glandă mamară, ovar, placenta, prostată, testicul, timus, uter. Esantioane tumorale: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALT, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, OSC_GC, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

Figura 5A

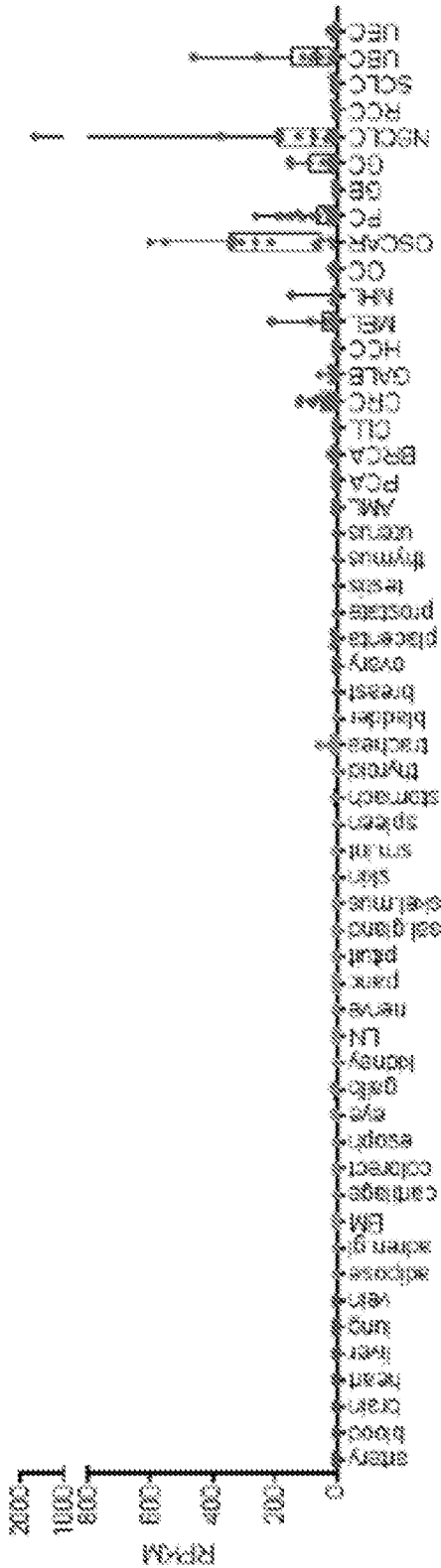
SEQ ID NO: 11: HAVCR1-001



Țesuturi (de la stânga la dreapta): Eșantioane normale: arteră, celule sanguine, creier, inimă, ficat, plămân, venă, țesut adipos, glandă suprarenală, măduvă osoasă, cartilaj, colon și rect, esofag, ochi, vezică biliară, rinichi, ganglion limfatic, nerv, pancreas, glandă pituitară, glandă salivară, mușchi scheletic, piele, intestin subțire, splină, stomac, tiroidă, trahee, vezică urinară, glandă mamară, ovar, placentă, prostată, testicul, timus, uter.

Eșantioane tumorale: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

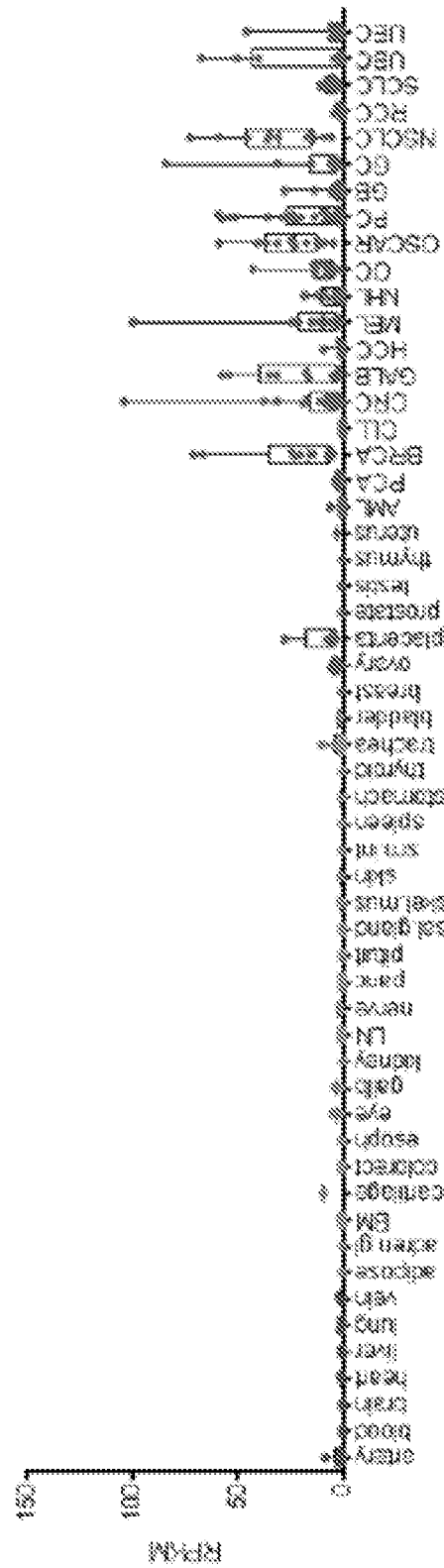
Figura 5B
SEQ ID NO: 14: MMP1-003



Țesuturi (de la stânga la dreapta): Eșantioane normale: arteră, celule sanguine, creier, inimă, ficat, plămân, venă, țesut adipos, glandă suprarenală, măduvă osoasă, cartilaj, colon și rect, esofag, ochi, vezica biliară, rinichi, ganglion limfatic, nerv, pancreas, glandă pituitară, glandă salivară, mușchi scheletic, piele, intestin subțire, splină, stomac, tiroidă, trahee, vezică urinară, glandă mamară, ovar, placentă, prostată, testicul, timus, uter.
Eșantioane tumorale: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

Figure 3C

SEQ ID NO: 21 COL6A3-015

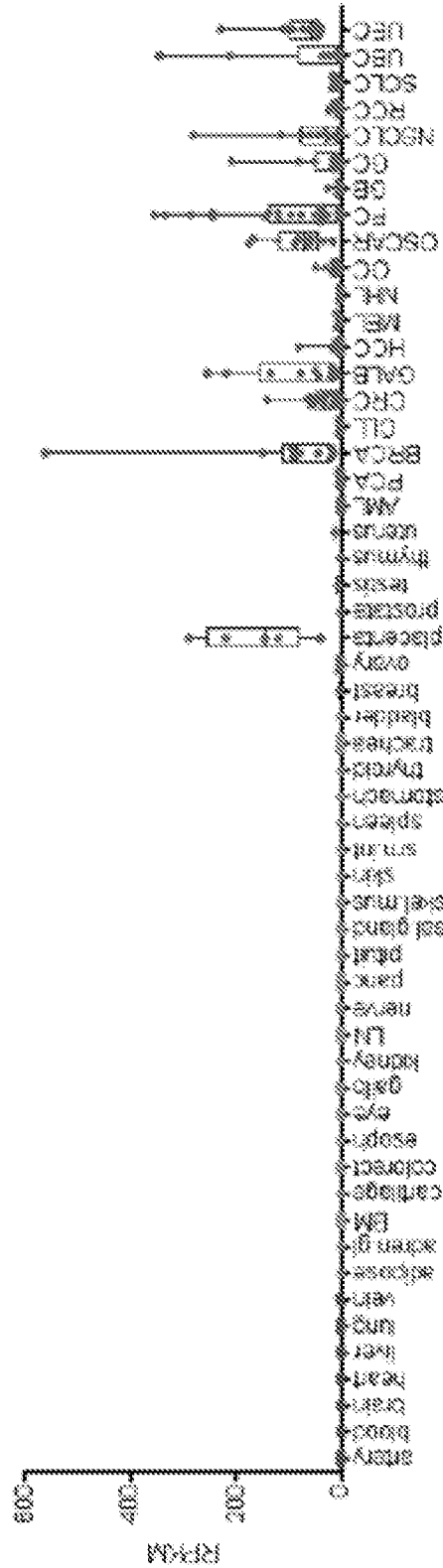


Testuturi (de la stânga la dreapta): Esantioane normale: arteră, celule sanguine, creier, inimă, ficat, plămân, venă, țesut adipos, glandă suprarenată, măduvă osoasă, cartilaj, colon și rect, esofag, ochi, vezica biliară, rinichi, ganglion limfatic, nerv, pancreas, glandă pituitară, glandă salivară, mușchi scheletic, piele, intestin subțire, splină, stomac, tiroidă, trahee, vezică urinară, glandă mamară, ovar, placentă, prostată, testicul, timus, uter.

Eşantınoane tumorale: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

OS 611041

SEQ ID NO: 24: MVP-002

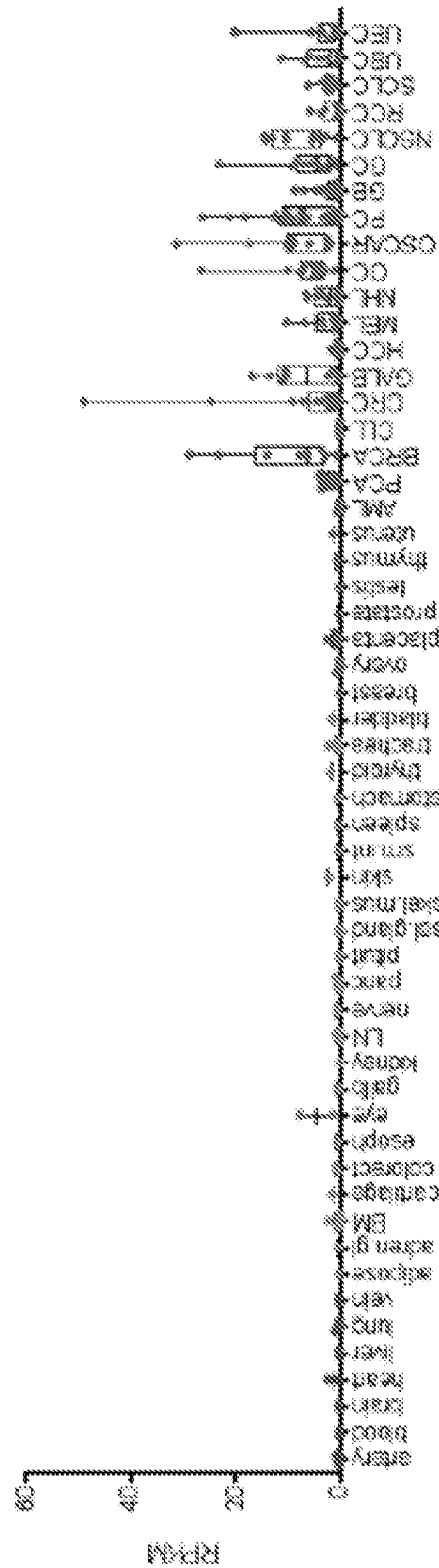


Tesuturi (de la stânga la dreapta): Esantioane normale: arteră, celule sanguine, creier, inimă, ficat, plămân, venă, țesut adipos, glandă suprarenală, măduvă osoasă, cartilaj, colon și rect, esofag, ochi, vezică biliară, rinichi, ganglion limfatic, nerv, pancreas, glandă pituitară, glandă salivară, mușchi scheletic, piele, intestin subțire, splină, stomac, tiroidă, trahee, vezică urinară, glandă mamară, ovar, placenta, prostată, testicul, timus, uter.

Esantioane tumorale: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

35

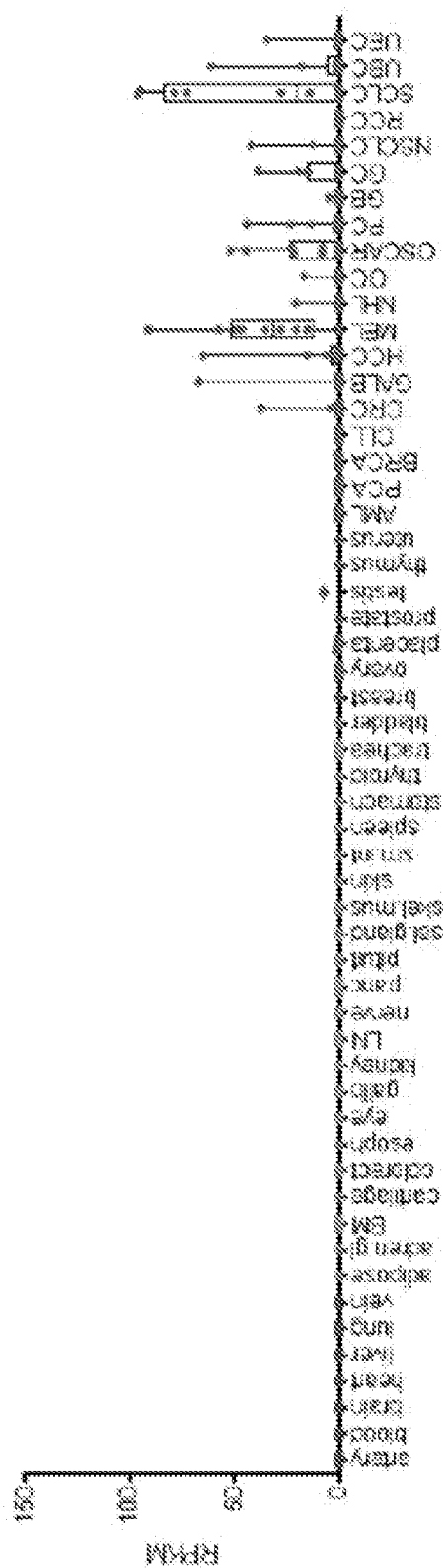
SEQ ID NO: 25: MXRAS-003



Tesuturi (de la stânga la dreapta): Esantioane normale: arteră, celule sanguine, creier, inimă, ficat, plămân, venă, țesut adipos, glandă suprarenală, măduvă osoasă, cartilaj, colon și rect, esofag, ochi, vezica biliară, rinichi, ganglion limfatic, nerv, pancreas, glandă pituitară, glandă salivară, mușchi scheletic, piele, intestin subțire, splină, stomac, tiroidă, trahee, vezică urinară, glandă mamară, ovar, placenta, prostată, testicul, timus, uter.

Eșantioane tumorale: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

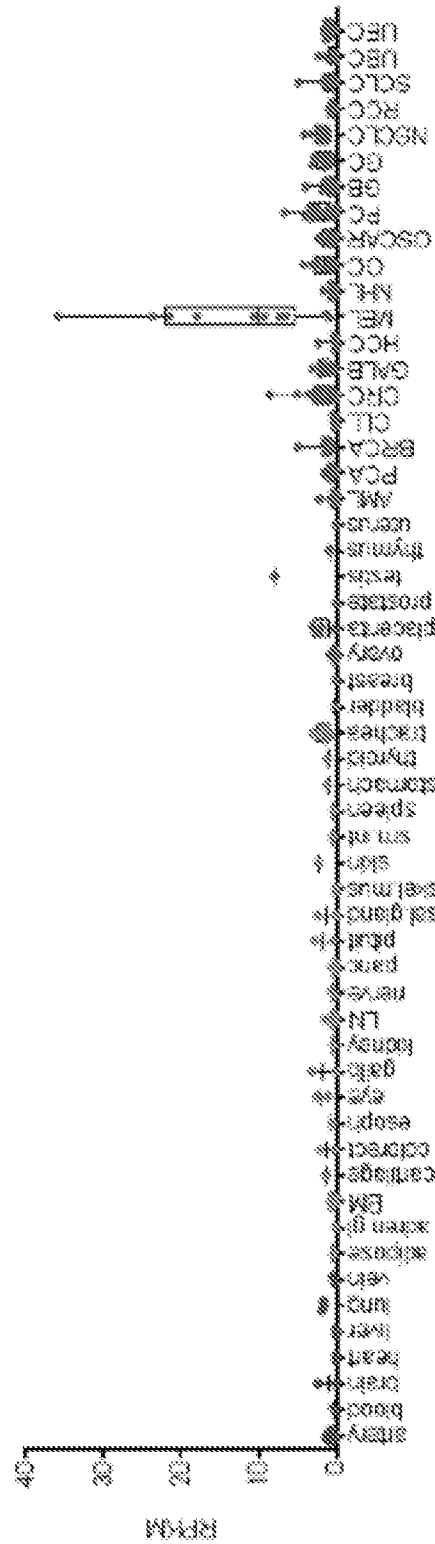
Figura 5F
SEQ ID NO: 40: MAGEA3-003



Tesuturi (de la stânga la dreapta): Eșantioane normale: arteră, celule sanguine, creier, inimă, ficat, plămân, venă, țesut adipos, glandă suprarenală, măduvă osoasă, cartilaj, colon și rect, esofag, ochi, vezică biliară, rinichi, ganglion limfatic, nerv, pancreas, glandă pituitară, glandă salivară, mușchi scheletic, piele, intestin subțire, splină, stomac, tiroidă, trahee, vezică urinară, glandă mamară, ovar, placenta, prostată, testicul, timus, uter.

Eșantioane tumorale: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

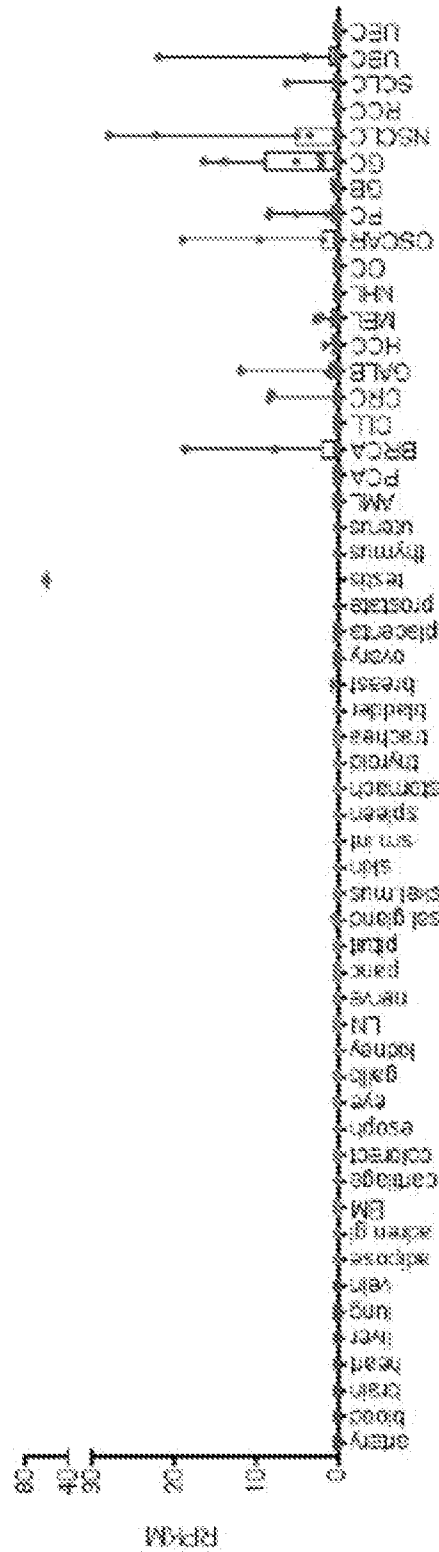
Figura 5G



Testături (de la stânga la dreapta): Eșantioane normale: arteră, celule sanguine, creier, inimă, ficat, plămân, venă, țesut adipos, glandă suprarenală, măduvă osoasă, cartilaj, colon și rect, esofag, ochi, vezica biliară, rinichi, ganglion limfatic, nerv, pancreas, glandă pituitară, glandă salivară, mușchi scheletic, piele, intestin subțire, splină, stomac, tiroidă, trahee, vezică urinară, glandă mamară, ovar, placenta, prostată, testicul, timus, uter.

Eșantioane tumorale: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

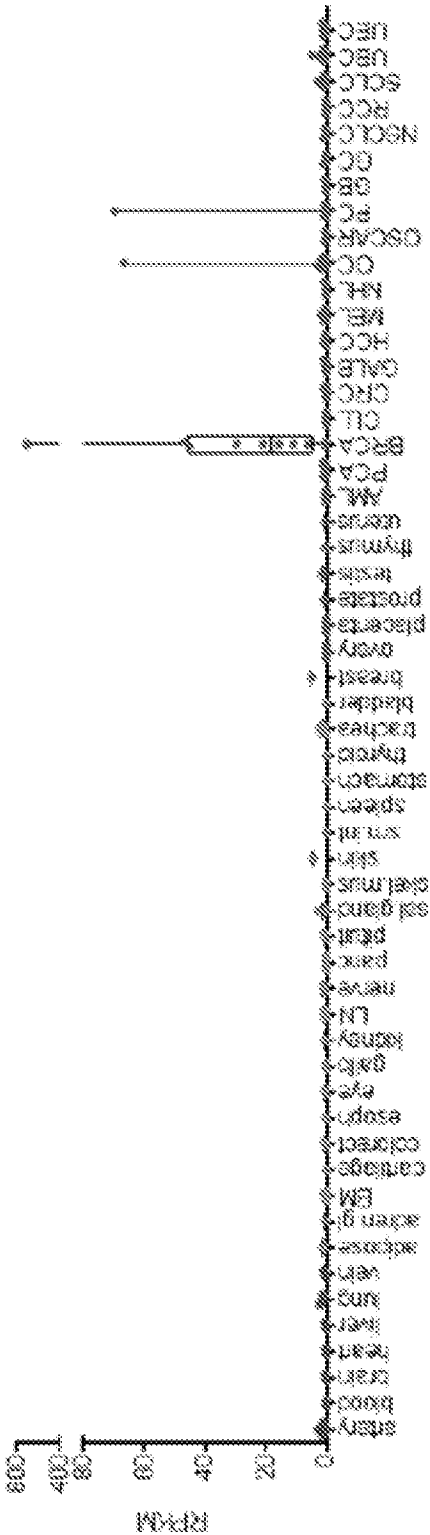
Figura 5J



Tesuturi (de la stânga la dreapta): Esantioane normale: arteră, celule sanguine, creier, inimă, ficat, plămân, venă, țesut adipos, glandă suprarenală, măduvă osoasă, cartilaj, colon și rect, esofag, ochi, vezica biliară, rinichi, ganglion limfatic, nerv, pancreas, glandă pituitară, glandă salivară, mușchi scheletic, piele, intestin subțire, splină, stomac, tiroidă, trahee, vezică urinară, glandă mamară, ovar, placenta, prostată, testicul, timus, uter.

Eşantioane tumorale: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

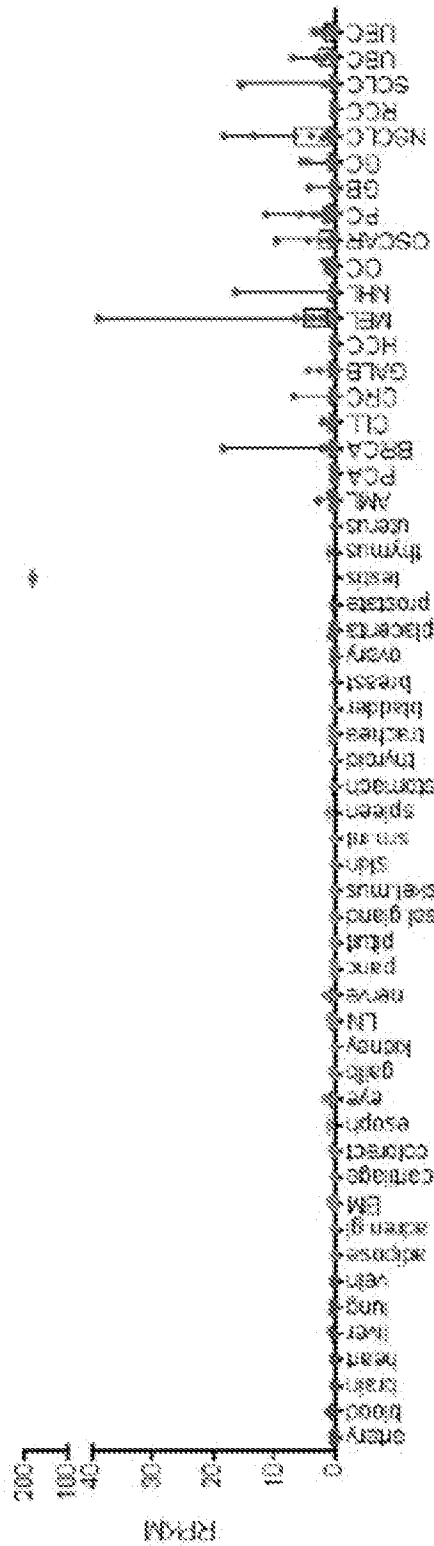
Figura 5K
SEQ ID NO: 155: CYP4Z-001



Țesuturi (de la stânga la dreapta): Eșantioane normale: arteră, celule sanguine, creier, inimă, ficat, plămân, venă, țesut adipos, glandă suprarenală, măduvă osoasă, cartilaj, colon și rect, esofag, ochi, vezica biliară, rinichi, ganglion limfatic, nerv, pancreas, glandă pituitară, glandă salivară, mușchi scheletic, piele, intestin subțire, splină, stomac, tiroidă, trachee, vezică urinară, glandă mamară, ovar, placentă, prostată, testicul, timus, uter.
Eșantioane tumorale: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

Figura 5M

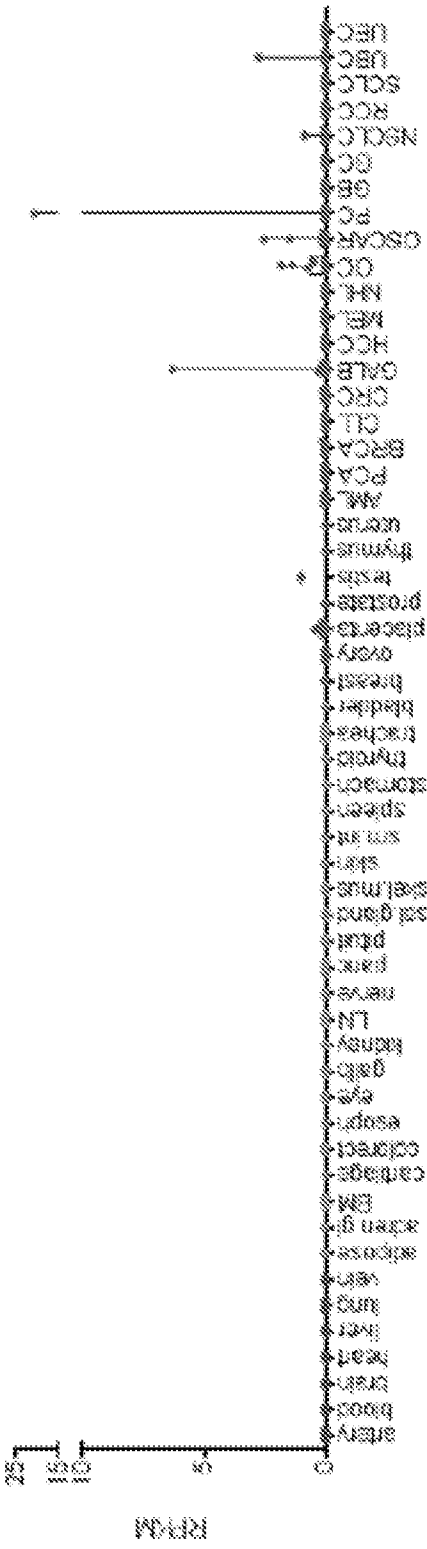
SEQ ID NO: 168: HORMAD1-001



Țesuturi (de la stânga la dreapta): Eșantioane normale: arteră, celule sanguine, creier, inimă, ficat, plămân, venă, țesut adipos, glandă suprarenală, măduvă osoasă, cartilaj, colon și rect, esofag, ochi, vezică biliară, rinichi, ganglion limfatic, nerv, pancreas, glandă pituitară, glandă salivară, mușchi scheletic, piele, intestin subțire, splină, stomac, tiroidă, trahee, vezică urinară, glandă mamară, ovar, placentă, prostată, testicul, timus, uter.

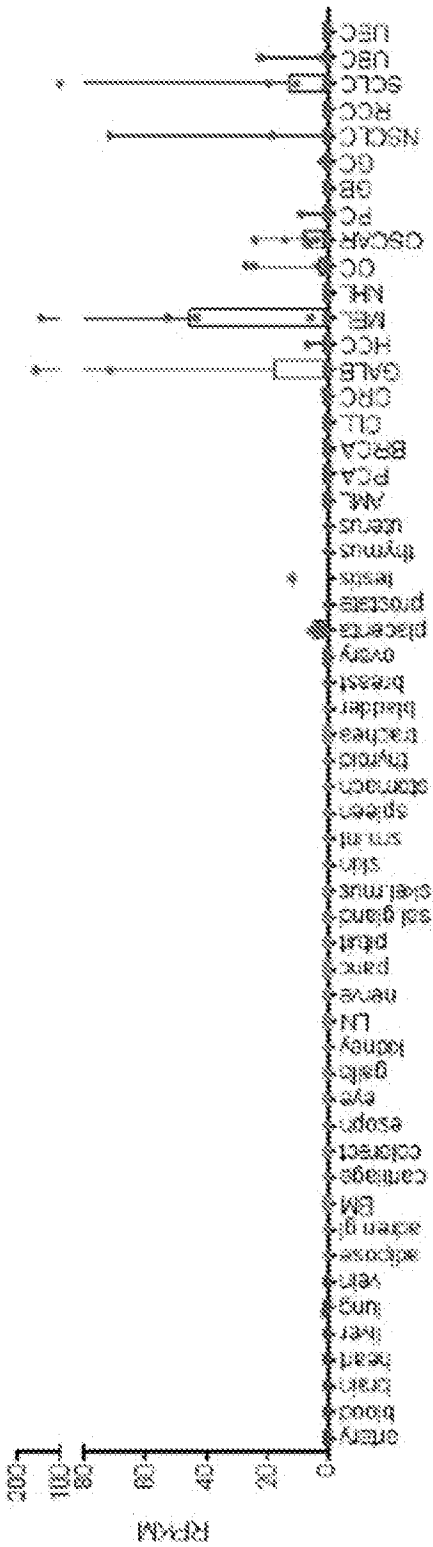
Eșantioane tumorale: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

Figura 5N
SEQ ID NO: 233: ZFP42-001



Țesuturi (de la stânga la dreapta): Eșantioane normale: arteră, celule sanguine, creier, inimă, ficat, plămân, venă, țesut adipos, glandă suprarenală, măduvă osoasă, cartilaj, colon și rect, esofag, ochi, vezica biliară, rinichi, ganglion limfatic, nerv, pancreas, glandă pituitară, glandă salivară, mușchi scheletic, piele, intestin subțire, splină, stomac, tiroidă, trahee, vezică urinară, glandă mamară, ovar, placenta, prostată, testicul, timus, uter.
Eșantioane tumorale: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

Figura 50
SEQ ID NO: 245: MAGEA4-003



Țesuturi (de la stânga la dreapta): Eșantioane normale: arteră, celule sanguine, creier, inimă, ficat, plămân, venă, țesut adipos, glandă suprarenală, măduvă osoasă, cartilaj, colon și rect, esofag, ochi, vezică biliară, rinichi, ganglion limfatic, nerv, pancreas, glandă pituitară, glandă salivară, mușchi scheletic, piele, intestin subțire, splină, stomac, tiroidă, trahee, vezică urinară, glandă mamară, ovar, placentă, prostată, testicul, timus, uter.
Eșantioane tumorale: AML, PCA, BRCA, CLL, CRC, GALB, HCC, MEL, NHL, OC, OSCAR, PC, GB, GC, NSCLC, RCC, SCLC, UBC, UEC

Figura 6

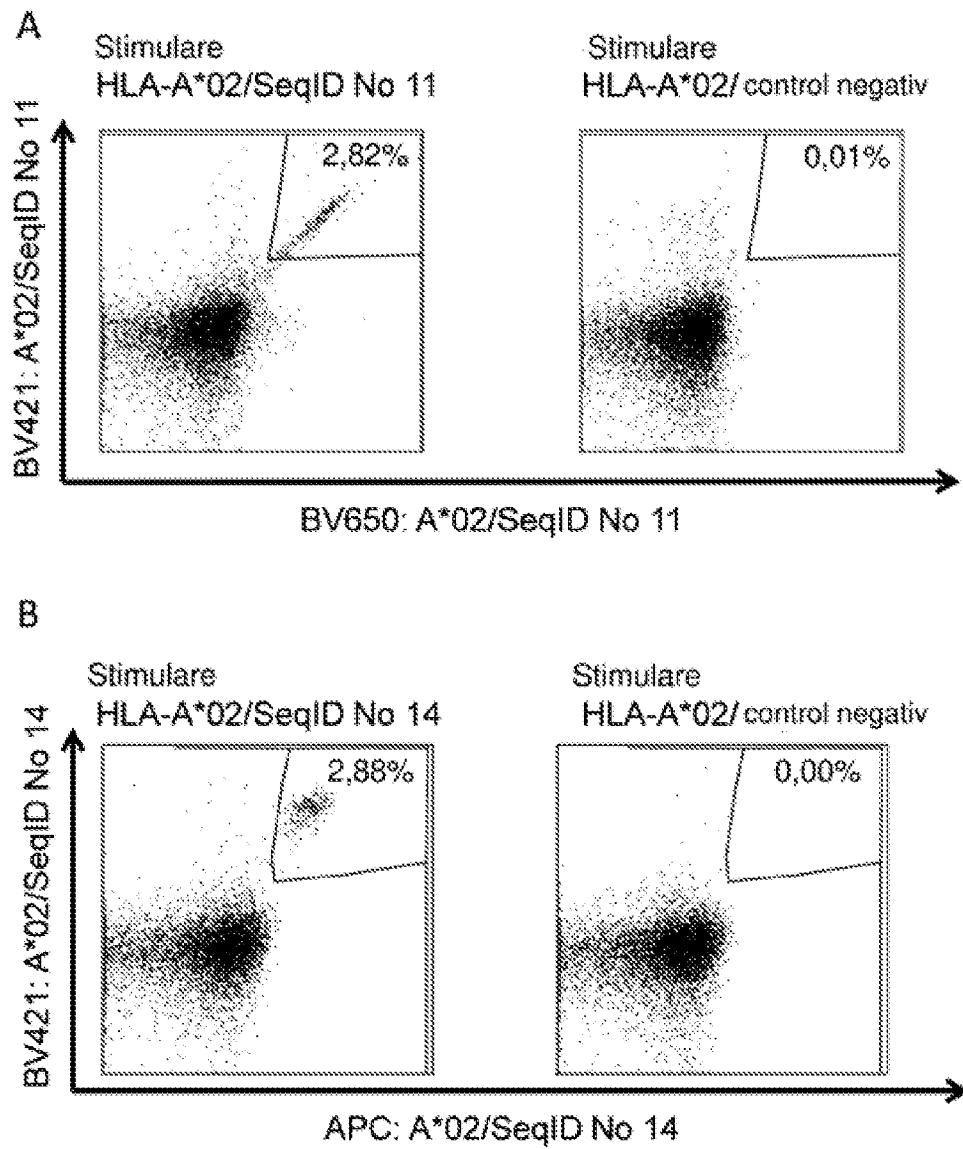


Figura 6 (continuare)

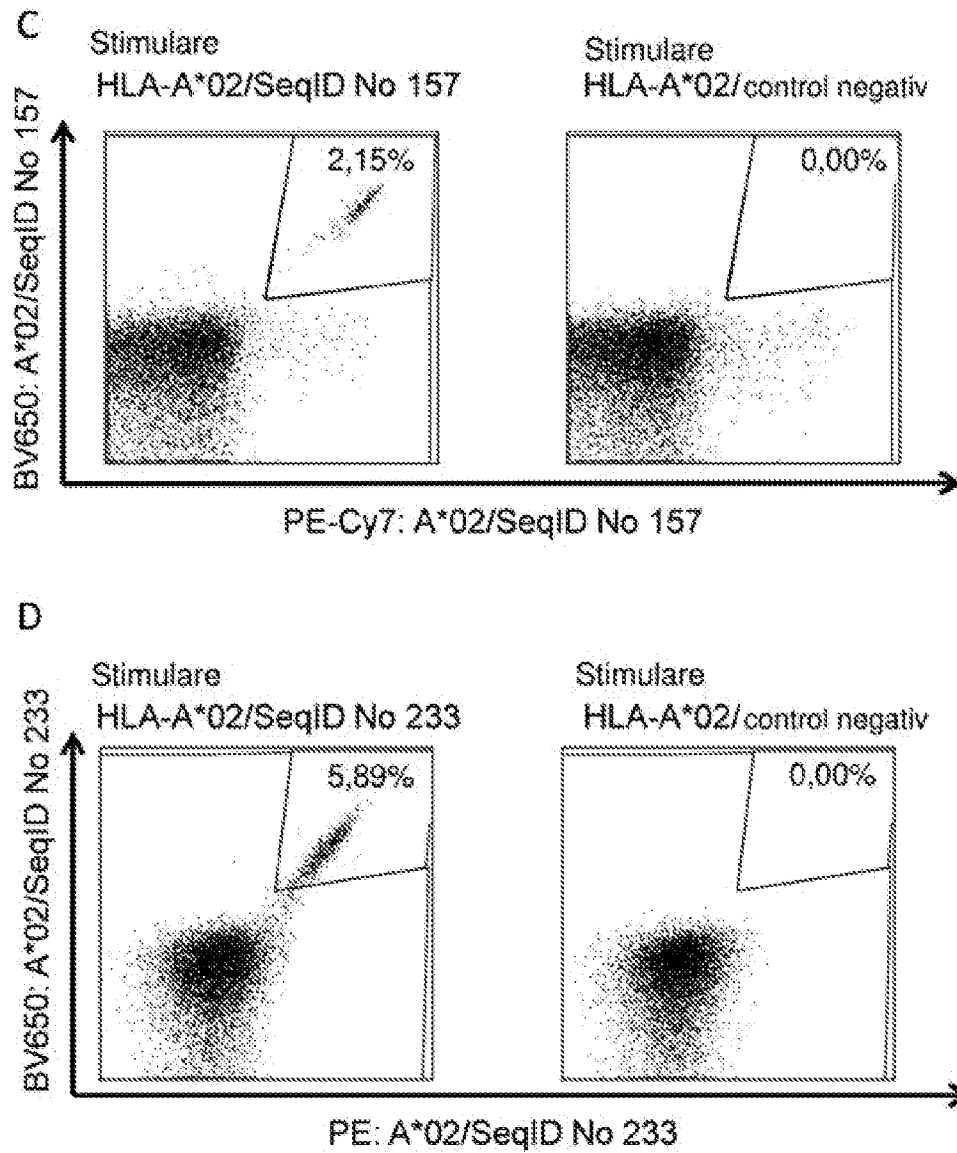


Figura 6 (continuare)

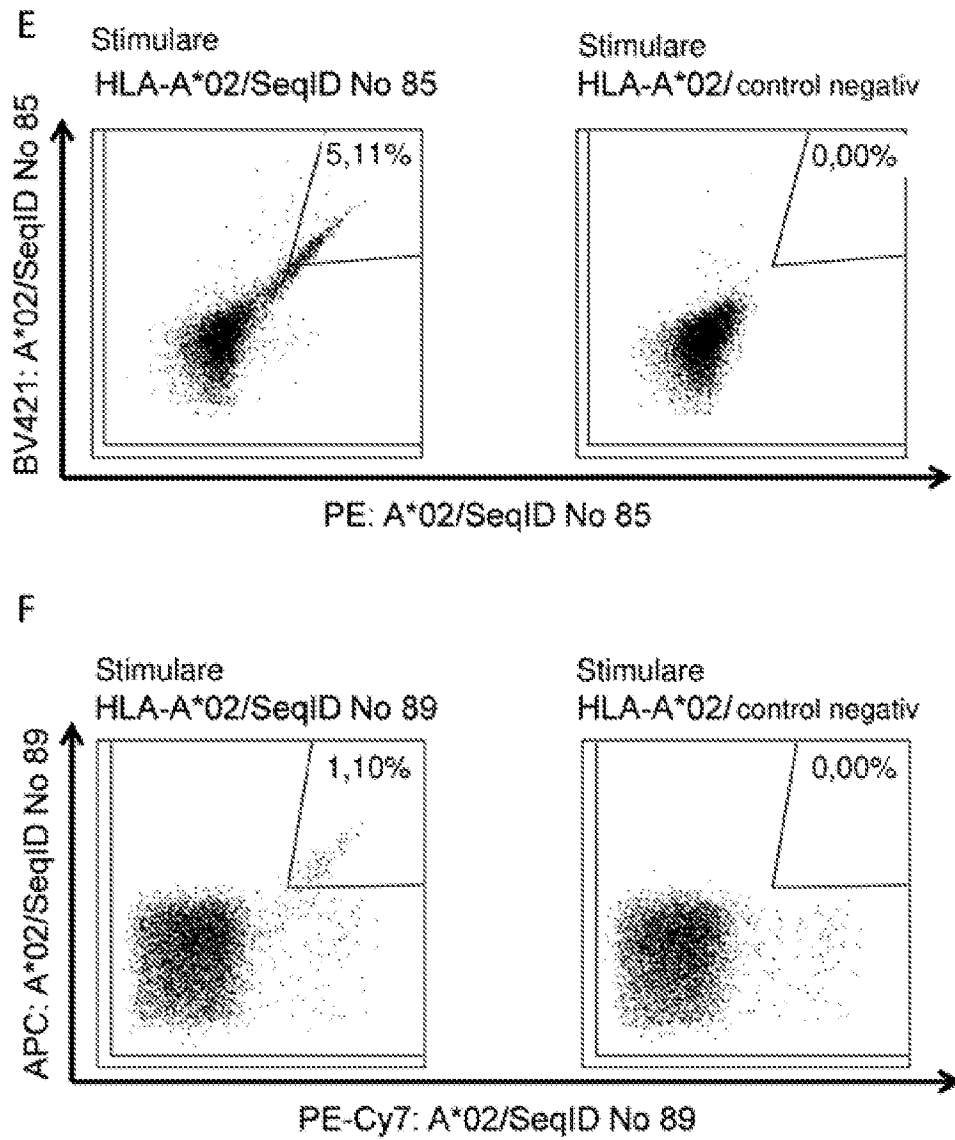


Figura 6 (continuare)

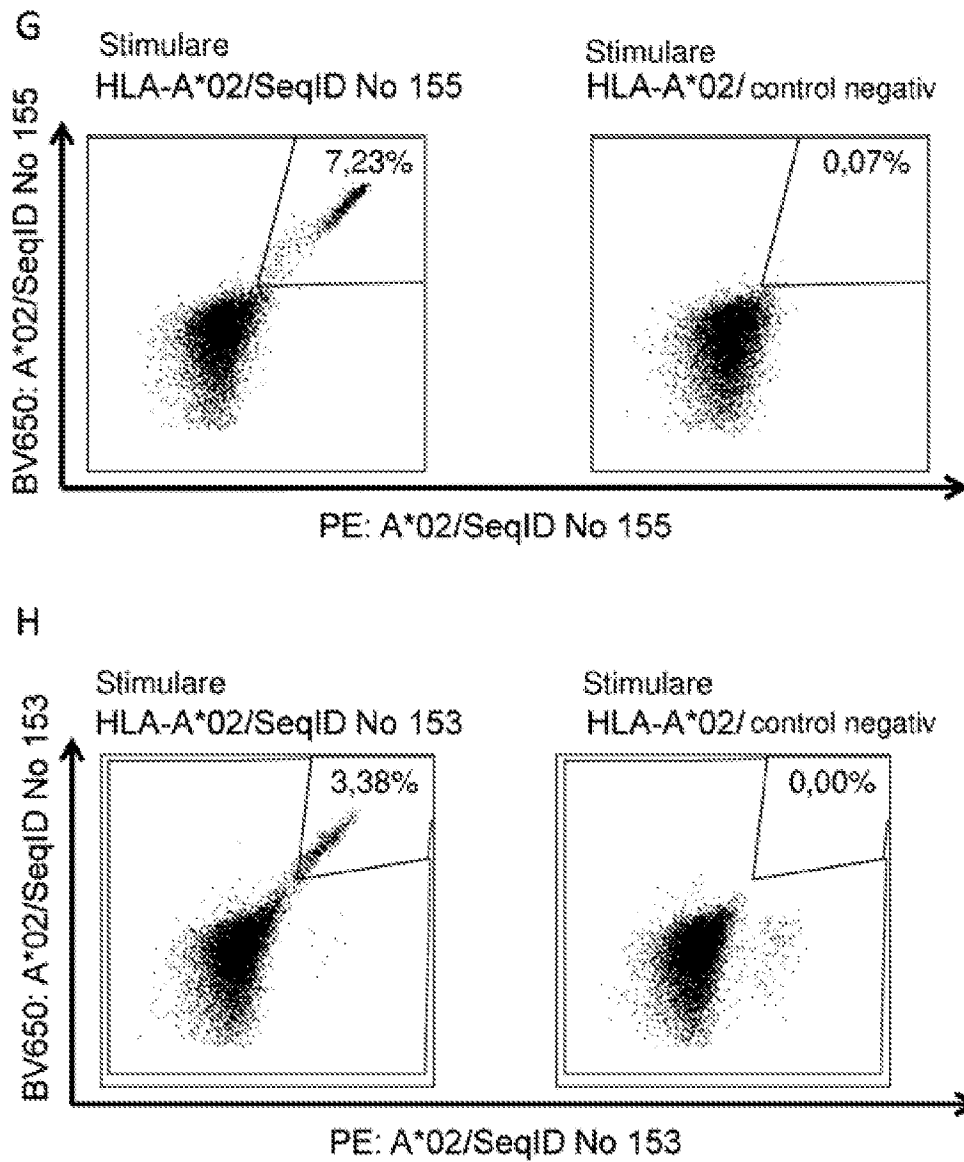


Figura 6 (continuare)

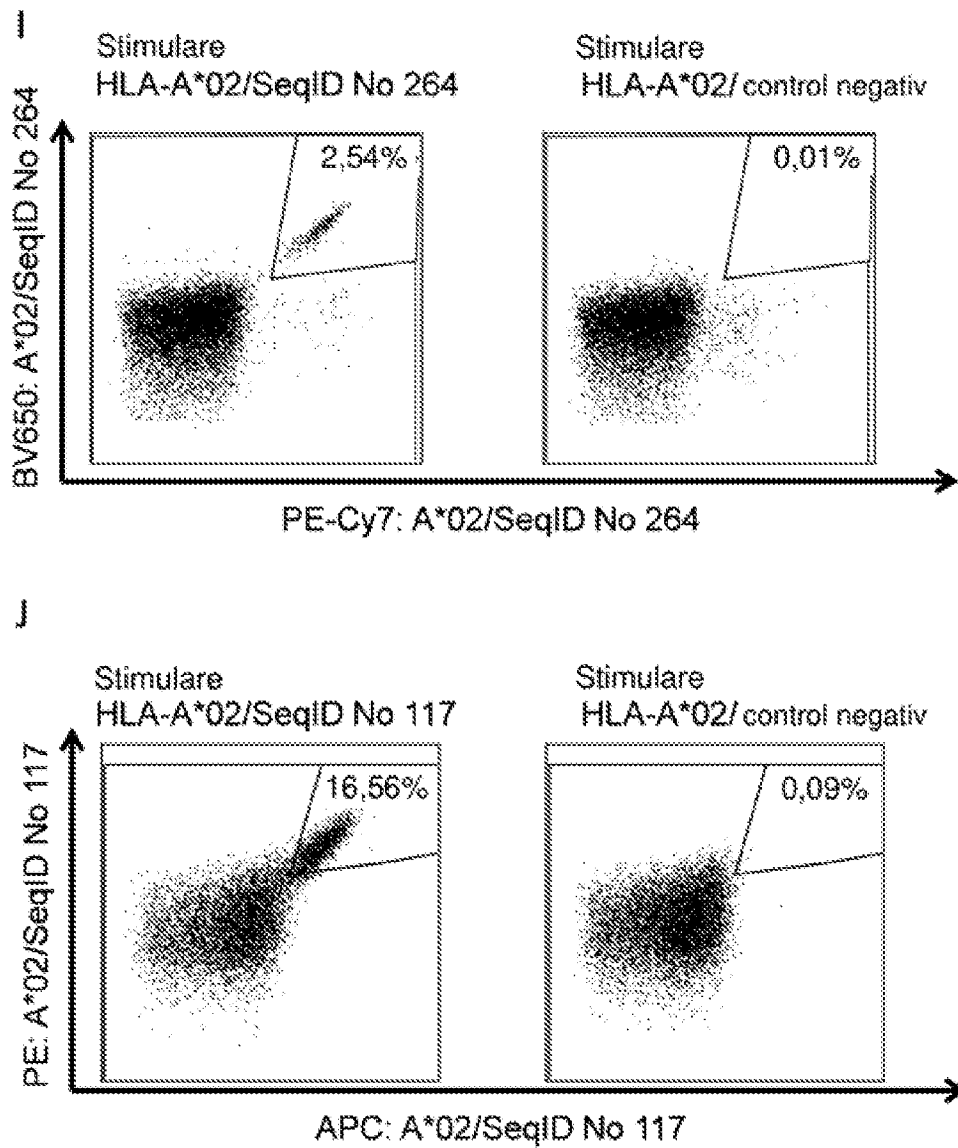


Figura 6 (continuare)

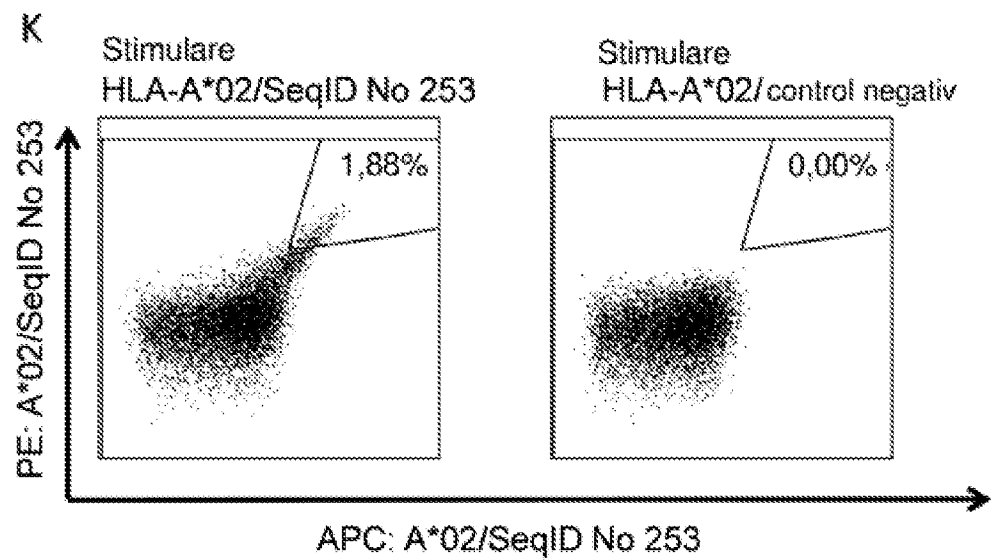


Figura 6 (continuare)

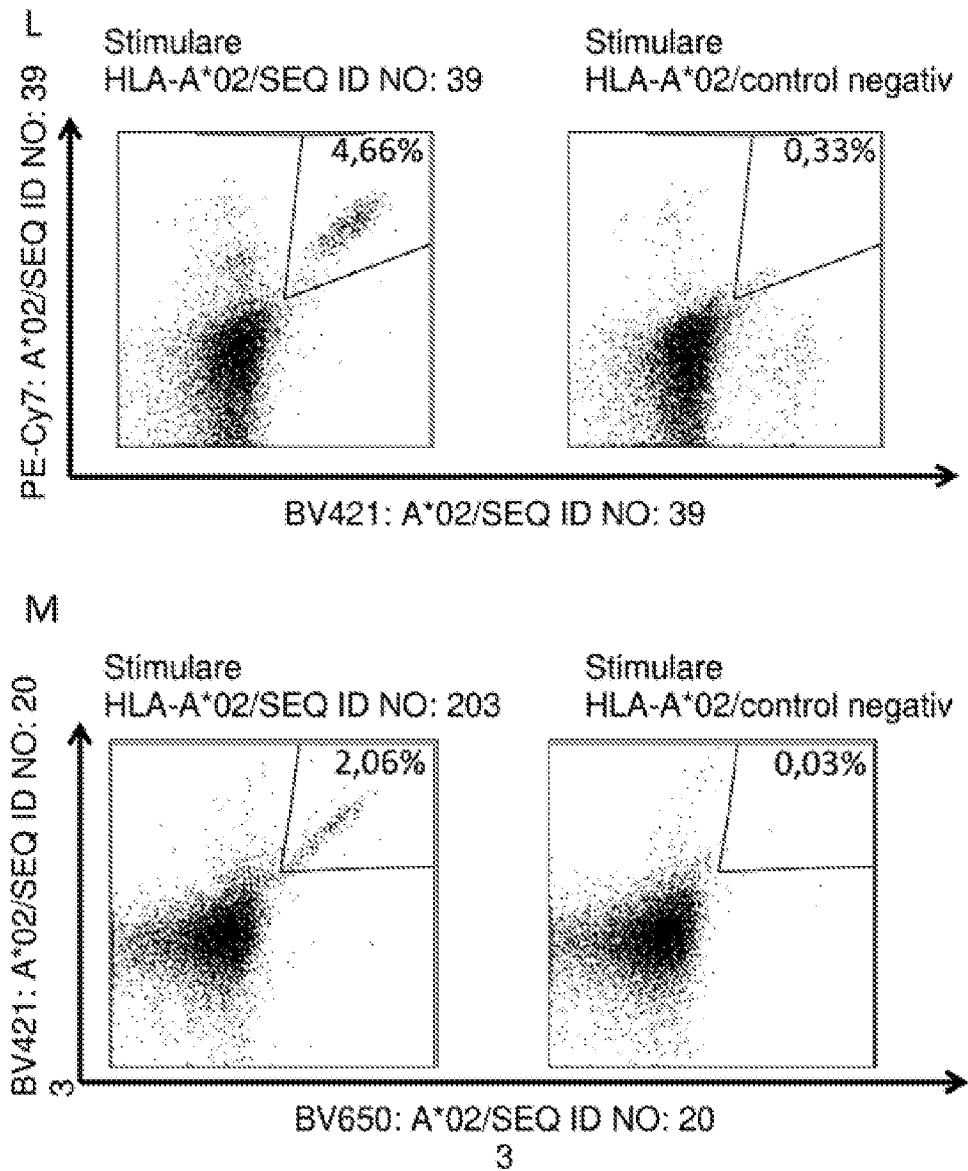


Figura 7A

Peptida: LLPTIFM (A*02)

SEQ. NO. 43

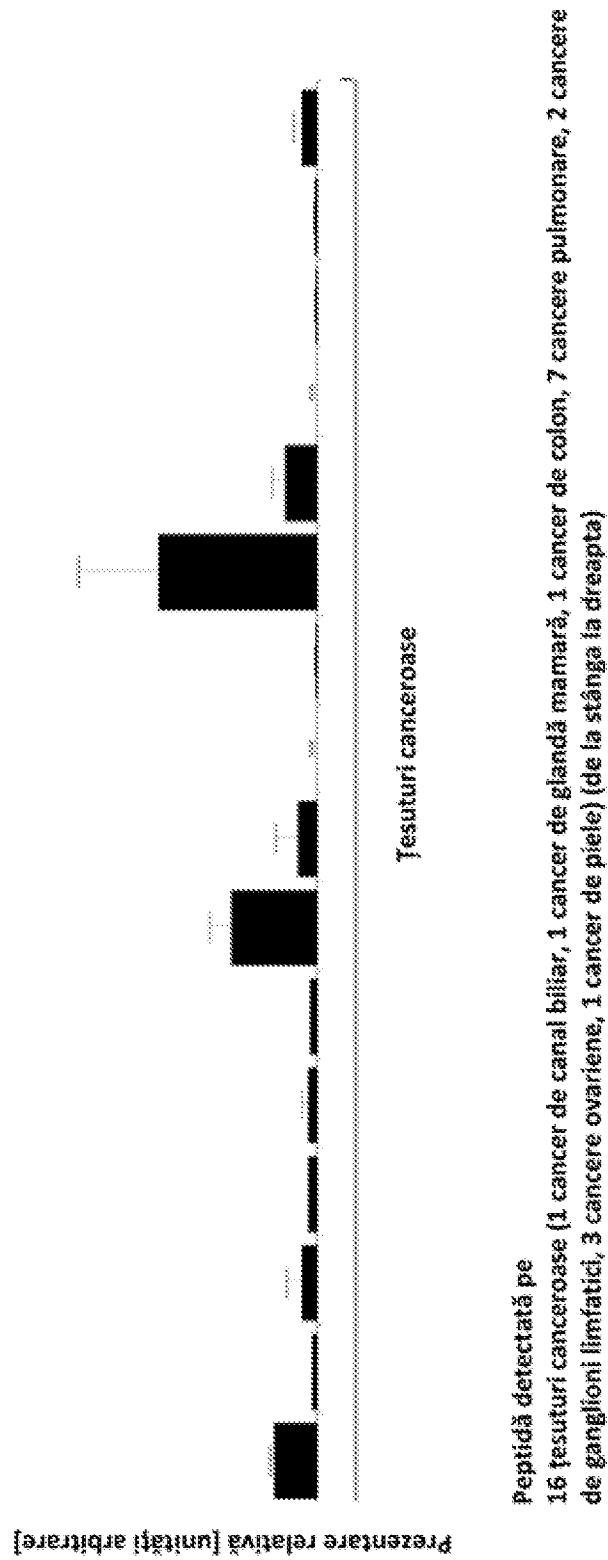
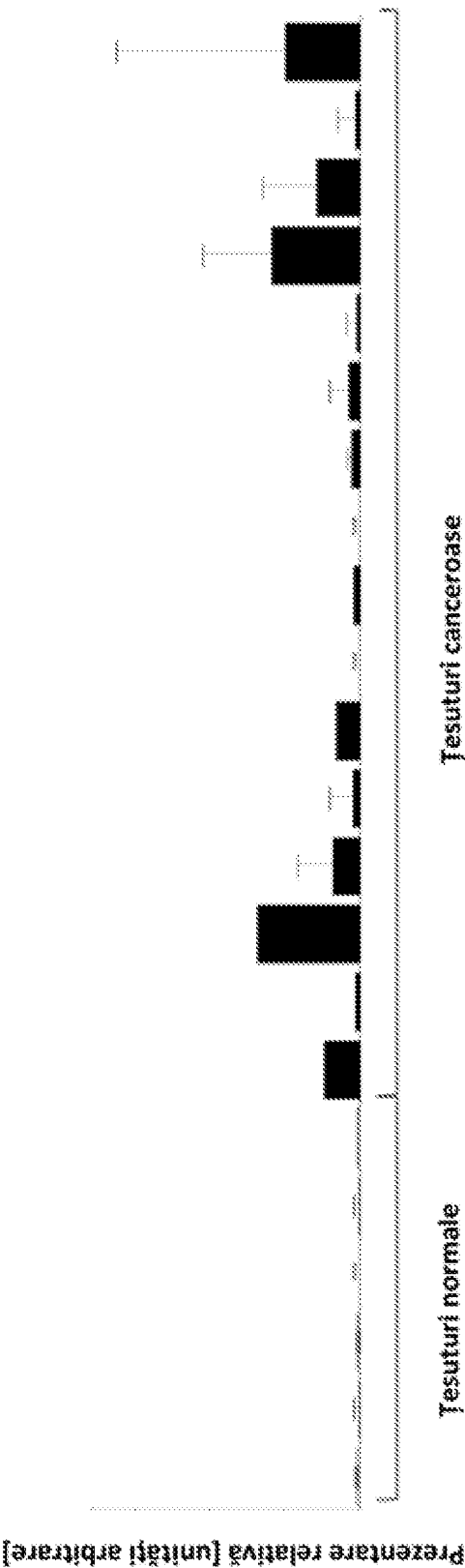


Figura 7B

Peptidă: ILVTSIFFL (A*02)
SEQ ID NO: 152

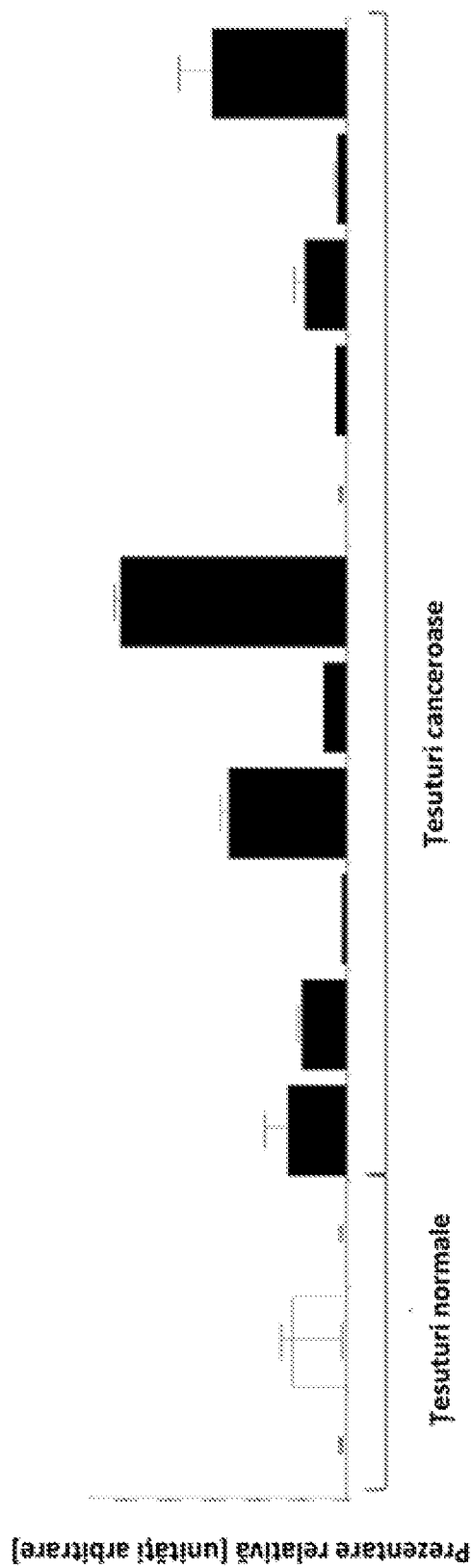


Peptidă detectată pe
6 țesuturi normale (1 ganglion limfatic, 5 splină), 16 țesuturi canceroase (8 cancere de leucemie feucocitară, 8 cancere de ganglioni limfatici) (de la stânga la dreapta)

Figura 7C

Peptidă: VILTSSPFL (A*02)

SEQ ID NO: 156



Peptidă detectată pe

3 țesuturi normale (1 plămân, 1 ganglion limfatic, 1 splină), 11 țesuturi canceroase (2 cancere de glandă mamară, 5 cancere de leucemie leucocitară, 3 cancere de ganglioni limfatici, 1 cancer de celule mieloide) (de la stânga la dreapta)