



MD/EP 3430027 T2 2024.03.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3430027 (13) T2

(51) Int. Cl.: A61K 39/00 (2006.01.01)
C07K 16/28 (2006.01.01)
A61P 35/00 (2006.01.01)
C07K 14/47 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2019 0100 (22) Data de depozit: 2017.03.15 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 17710904.8, 2017.03.15 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3430027, 2019.01.23 (31) Numărul cererii prioritare: 201604458; 201662308944 P (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2016.03.16; 2016.03.16 (33) Țara cererii prioritare: GB; US	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 03/2024, 2024.03.31 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 37/2023, 2023.09.13 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 02/2019, 2019.02.28
(71) Solicitant: IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH, DE (72) Inventatori: MAHR Andrea, DE; SCHOOR Oliver, DE; WEINSCHENK Toni, DE (73) Titular: IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH, DE (74) Mandatar autorizat: FOCȘA Valentin	

(54) Peptide pentru utilizare în imunoterapia împotriva cancerului pulmonar fără celule mici și a cancerului pulmonar cu celule mici

(57) Rezumat:

1

În general, prezenta descriere se referă la peptide, proteine, acizi nucleici și celule pentru utilizare în metode imunoterapice. În particular, prezenta descriere se referă la imunoterapia cancerului. Prezenta descriere se referă în plus la epitopi ai peptidelor celulelor T asociate cu tumoarea, singure sau în asociere cu alte peptide asociate tumorilor care pot să servească, de exemplu, ca ingrediente active farmaceutice ale compozițiilor de vaccinuri care stimulează răspunsuri imune antitumorale,

2

sau pentru a stimula celulele T *ex vivo* și transferul la pacienți. Peptidele legate la moleculele complexului cu histocompatibilitate majoră (MHC), sau peptide ca atare, pot fi, de asemenea, ținte ale anticorpilor, receptorilor celulelor T solubile și a altor molecule de legare.

Secvențe: 25
Revendicări: 4
Figuri: 6

MD/EP 3430027 T2 2024.03.31

(54) Peptide for use in immunotherapy against non-small cell lung cancer and small cell lung cancer

(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: 25

Claims: 4

Fig.: 6

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

În general, prezenta descriere se referă la peptide, proteine, acizi nucleici și celule pentru utilizare în metode imunoterapice. În particular, prezenta descriere se referă la imunoterapia cancerului. Prezenta descriere se referă în plus la epitopi ai peptidelor celulelor T asociate cu tumoarea, singure sau în asociere cu alte peptide asociate tumorilor care pot să servească, de exemplu, ca ingrediente active farmaceutice ale compozițiilor de vaccinuri care stimulează răspunsuri imune antitumorale, sau pentru a stimula celulele T *ex vivo* și transferul la pacienți. Peptidele legate la moleculele complexului cu histocompatibilitate majoră (MHC), sau peptide ca atare, pot fi, de asemenea, ținte ale anticorpilor, receptorilor celulelor T solubile și a altor molecule de legare.

Prezenta descriere se referă, în continuare, la utilizarea peptidelor de mai sus pentru generarea receptorilor specifici celulelor T (TCR) care se leagă la antigeni asociați tumorii (TAA) pentru țintirea celulelor canceroase, generarea celulelor T care le exprimă, și metode de tratare a cancerelor care le utilizează. Secvențele de peptide dezvoltate aici și variantele lor derivate din moleculele HLA clasa I ale celulelor tumorale umane se pot utiliza în compoziții de vaccinuri pentru declanșarea răspunsurilor imune anti-tumorale, sau ca ținte pentru dezvoltarea compușilor activi farmaceutici/imunologici și celulelor. Prezenta invenție se referă la o peptidă care are secvența de aminoacizi KVLEHVVRV (SECV ID NR: 1).

STADIUL TEHNICII ÎN DOMENIUL CARE FORMEAZĂ OBIECTUL INVENȚIEI

Cancerul pulmonar fără celule mici (NSCLC) este denumit astfel în conformitate cu dimensiunea celulelor canceroase atunci când sunt observate la microscop și trebuie diferențiat de cancerul cu celule mici (SCLC). NSCLC reprezintă aproximativ 85% până la 90% din toate cancerele pulmonare (American Cancer Society, 2015).

Ambele tipuri de cancer (SCLC și NSCLC) reprezintă a doua cea mai comună formă de cancer atât la bărbați cât și la femei. Cancerul pulmonar este cauza principală a deceselor din cauza cancerului, care reprezintă aproximativ 25%. Astfel, din ce în ce mai mulți oameni mor din cauza cancerului pulmonar decât din cauza cancerelor de colon, sân și prostată combinate, în fiecare an. În plus, ambele tipuri de cancer reprezintă aproximativ 13% (peste 1,8 milioane) din toate cancerele noi. Cancerul pulmonar apare în la populația vârstnică. Vârsta medie în momentul diagnosticării fiind aproximativ 70. Mai puțin de 2% din toate cazurile sunt diagnosticate la oameni mai tineri de 45.

Există patru tipuri principale de NSCLC, respectiv, adenocarcinomul, carcinomul cu celule scuamoase, carcinomul bronhoalveolar, carcinomul cu celule mari. Adenocarcinoamele și carcinoamele cu celule scuamoase sunt cele mai comune tipuri de NSCLC pe baza morfologiei celulare (Travis și colab., Lung Cancer Principles and Practice, Lippincott-Raven, New York, 361-395, 1996). Adenocarcinoamele se caracterizează printr-o localizare mai periferică în plămân și adesea prezintă o mutație în oncogene K-ras (Gazdar și colab., Anticancer Res., 14, 261-267, 1994). Carcinoamele cu celule scuamoase sunt în mod obișnuit localizate mai central și frecvent poartă mutații ale genei p53 (Niklinska și colab., Folia Histochem. Cytobiol., 39, 147-148, 2001).

Au fost raportate multe modificări genetice asociate cu dezvoltarea și progresul cancerului pulmonar, însă mecanismele moleculare exacte rămân neclare (Sozzi, G. Eur. J. Cancer 37: 63-73 (2001)). Majoritatea NSCLC se caracterizează prin prezența mutației ras ceea ce face ca pacientul să fie relativ insensibil la tratamentul cu inhibitori ai kinazelor cunoscuți. Ca urmare, tratamentele curente împotriva cancerului pulmonar sunt, în general, limitate la medicamente citotoxice, intervenție chirurgicală, și terapie prin radiație. În ultima decadă agenții citotoxici nou dezvoltați incluzând paclitaxel, docetaxel, gemcitabină, și vinorelbina au apărut ca să ofere posibilități terapeutice multiple pentru pacienții cu NSCLC avansat; totuși, fiecare dintre noile regimuri poate să asigure numai beneficii de supraviețuire modeste în comparație cu terapiile bazate pe cisplatină (Schiller, J. H. și colab., N. Engl. J. Med. 346: 92-98 (2002); Kelly, K. și colab., J. Clin. Oncol. 19: 3210-3218 (2001)). Prin urmare, sunt așteptate cu nerăbdare de clinicieni noi strategii terapeutice, cum ar fi dezvoltarea agenților cu țintire moleculară.

Imunoterapia cancerului reprezintă o opțiune de țintire specifică a celulelor canceroase cu minimizarea efectelor secundare. Imunoterapia cancerului utilizează existența antigenilor asociați tumorilor.

Clasificarea curentă a antigenilor asociați tumorilor (TAA) poate fi făcută în următoarele grupuri:

a) Antigeni pentru cancerul testicular: Primii TAA identificați vreodată care pot fi recunoscuți de celulele T aparțin acestei clase, care au fost numiți inițial antigeni ai cancerului testicular (CT) întrucât

expresia membrilor acesteia în tumorile umane diferite histologic iar, printre țesuturile normale, numai în spermatoците/spermatogonii de testicul și, ocazional, în placentă. Întrucât celulele testiculelor nu exprimă moleculele HLA de clasa I și II, acești antigeni nu pot fi recunoscuți de celulele T în țesuturile normale și, prin urmare, pot fi considerați ca fiind specifici imunologic tumorii. Exemple binecunoscute de antigeni CT sunt membrii ai familiei MAGE și NY-ESO-1.

b) Antigeni de diferențiere: Acești TAA sunt împărțiți între tumori și țesutul normal din care a apărut tumora. Majoritatea antigenilor de diferențiere cunoscuți se găsesc în melanoame și melanocite normale. Multe dintre aceste proteine legate de descendența melanocitelor sunt implicate în biosinteza melaninei și, prin urmare, nu sunt specifice tumorii, însă sunt totuși utilizate pe scară largă pentru imunoterapia cancerului. Exemplele includ, însă nu se limitează la, tirozinază și Melan-A/MART-1 pentru melanom sau PSA pentru cancerul de prostată.

c) TAA supraexprimați: Genele care codifică TAA exprimate pe scară largă au fost detectate în diferite tipuri de tumori din punct de vedere histologic, precum și în multe țesuturi normale, în general cu niveluri de expresie mai scăzute. Este posibil ca mulți dintre epitopii procesați și potențial prezentați de țesuturile normale să fie sub nivelul pragului pentru recunoașterea celulelor T, în timp ce supraexpresia lor în celulele tumorale poate declanșa un răspuns anticancer prin ruperea toleranței stabilite anterior. Exemple proeminente pentru această clasă de TAA sunt Her-2/neu, survivina, telomeraza sau WT1.

d) Antigeni specifici tumorii: Acești TAA unici apar din mutații ale genelor normale (cum ar fi β -catenina, CDK4 etc.). Unele dintre aceste modificări moleculare sunt asociate cu transformarea și/sau progresia neoplazică. Antigenii specifici tumorii sunt, în general, capabili să inducă răspunsuri imune puternice fără a suporta riscul de reacții autoimune împotriva țesuturilor normale. Pe de altă parte, acești TAA sunt în majoritatea cazurilor relevanți doar pentru tumora exactă pe care au fost identificate și, de obicei, nu sunt împărțite între multe tumori individuale. Specificitatea tumorală (sau asocierea) a unei peptide poate apărea și dacă peptida provine dintr-un exon (asociat) tumoral în cazul proteinelor cu izoforme (asociate) specifice tumorii.

e) TAA care rezultă din modificări post-tranlaționale anormale: astfel de TAA pot apărea din proteine care nu sunt nici specifice, nici supraexprimate în tumori, dar totuși devin tumori asociate prin procese post-tranlaționale active în principal în tumori. Exemple pentru această clasă apar din modelele de glicozilare modificate care conduc la epitopi noi în tumori cum ar fi pentru MUC1 sau evenimente precum imbinarea proteinei în timpul degradării care poate fi sau nu specifică tumorii.

f) Proteine oncovirale: Acești TAA sunt proteine virale care pot juca un rol critic în procesul oncogen și, întrucât sunt străine (nu de origine umană), pot evoca un răspuns al celulelor T. Exemple de astfel de proteine sunt proteina virusului papiloma uman tip 16, E6 și E7, care sunt exprimate în carcinomul de col uterin.

Imunoterapia pe bază de celule T vizează epitopi peptidici derivați din proteine asociate tumorii sau specifice tumorii, care sunt prezentate prin moleculele complexe cu histocompatibilitate majoră (MHC). Antigenii care sunt recunoscuți de limfocitele T specifice tumorii, *adică* epitopii acestora, pot fi molecule derivate din toate clasele de proteine, cum ar fi enzime, receptori, factori de transcripție etc. care sunt exprimate și, în comparație cu celulele nemodificate de aceeași origine, de obicei suprareglate în celulele tumorii respective.

Există două clase de molecule de MHC, MHC clasa I și MHC clasa II. Moleculele MHC din clasa I sunt compuse dintr-un lanț greu alfa și beta-2-microglobulină, moleculele MHC din clasa II dintr-un lanț alfa și un lanț beta. Conformarea lor tridimensională are ca rezultat un șanț de legare, care este utilizat pentru interacțiunea necovalentă cu peptida. Moleculele MHC din clasa I pot fi găsite pe majoritatea celulelor nucleate. Ele prezintă peptidă care rezultă din scindarea proteolitică a proteinelor predominant endogene, a produselor ribozomale defecte (DRIP) și a peptidei mai mari. Totuși, peptide derivate din compartimente endozomale sau din surse exogene se găsesc frecvent și pe moleculele MHC din clasa I. Acest mod non-clasic de prezentare în clasa I este denumit în literatură prezentare încrucișată (Brossart și Bevan, 1997; Rock și colab., 1990). Moleculele MHC din clasa II pot fi găsite predominant pe celulele profesionale prezentatoare de antigen (APC) și în principal prezintă peptide ale proteinelor exogene sau transmembranare care sunt preluate de APC, de exemplu, în timpul endocitozei și sunt ulterior procesate.

Complecșii peptidelor și MHC din clasa I sunt recunoscuți de celulele T CD8-pozitive care poartă receptorul de celule T (TCR) adecvat, în timp ce complecșii peptidelor și moleculele de MHC din clasa II sunt recunoscuți de celulele T helper CD4-pozitive purtând TCR corespunzător. Este bine cunoscut faptul că TCR, peptida și MHC sunt astfel prezente într-o cantitate stoechiometrică de 1:1:1.

Celulele T helper pozitive CD4 joacă un rol important în inducerea și susținerea răspunsurilor eficiente de către celulele T citotoxice CD8 pozitive. Identificarea epitopilor celulelor T pozitive pentru CD4 derivați din antigenii asociați tumorii (TAA) este de mare importanță pentru dezvoltarea de produse

farmaceutice pentru declanșarea răspunsurilor imune antitumorale (Gnjatic *și colab.*, 2003). La locul tumorii, celulele T helper susțin un mediu de citokine prietenos cu celulele T citotoxice (CTL-) (Mortara *și colab.*, 2006) și atrag celule efectoare, de exemplu, CTL, celule natural killer (NK), macrofage și granulocite (Hwang *și colab.*, 2007).

5 În absența inflamației, expresia moleculei MHC din clasa II este limitată în principal la celulele sistemului imunitar, în special la celulele profesionale prezentatoare de antigen (APC), de exemplu, monocite, celule derivate din monocite, macrofage, celule dendritice. La pacienții cu cancer, s-a descoperit că celulele tumorii exprimă moleculele MHC din clasa II (Dengjel *și colab.*, 2006). Peptida alungită (mai lungă) din descriere poate funcționa ca epitopi activi MHC din clasa II.

10 Celulele T-helper, activate de epitopii MHC din clasa II, joacă un rol important în orchestrarea funcției efectoare a CTL în imunitatea antitumorală. Epitopii celulelor T-helper care declanșează un răspuns al celulei T-helper de tip TH1 susțin funcțiile efectoare ale celulelor T ucigașe pozitive pentru CD8, care includ funcții citotoxice direcționate împotriva celulelor tumorale care prezintă complexi peptidă/MHC asociați tumorii pe suprafața lor celulară. În acest mod, epitopii peptidici de celule T-helper asociate cu tumori, singuri sau în asocieri cu alte peptide asociate tumorilor, pot servi ca ingrediente active farmaceutic ale compozițiilor de vaccinuri care stimulează răspunsurile imune anti-tumorale.

15 S-a demonstrat pe modele animale de mamifere, de exemplu, șoareci, că chiar și în absența limfocitelor T pozitive pentru CD8, celulele T pozitive pentru CD4 sunt suficiente pentru inhibarea manifestării tumorilor prin inhibarea angiogenezei prin secreția de interferon-gamma (IFN γ) (Beatty *și Paterson*, 2001; Mumberg *și colab.*, 1999). Există dovezi pentru celulele T CD4 ca efectori antitumorali direcți (Braumuller *și colab.*, 2013; Tran *și colab.*, 2014).

20 Întrucât expresia constitutivă a moleculei HLA clasa II este de obicei limitată la celulele imune, posibilitatea de a izola peptida de clasa II direct din tumorile primare nu a fost considerată anterior posibilă. Totuși, Dengjel *și colab.* au avut succes în identificarea unui număr de epitopi MHC din clasa II direct din tumori (WO 2007/028574, EP 1 760 088 B1).

25 Întrucât ambele tipuri de răspuns, dependente de CD8 și CD4, contribuie împreună și sinergic la efectul antitumoral, identificarea și caracterizarea antigeniilor asociați tumorii recunoscuți fie de celulele T CD8+ (ligand: moleculă MHC din clasa I + epitop peptidic) sau de către celulele T-helper pozitive pentru CD4 (ligand: moleculă MHC din clasa II + epitop peptidic) este importantă în dezvoltarea vaccinurilor tumorale.

30 Pentru ca o peptidă MHC de clasă I să declanșeze (provoace) un răspuns imun celular, aceasta trebuie, de asemenea, să se lege la o moleculă MHC. Acest proces este dependent de alela moleculei MHC și de polimorfismele specifice ale secvenței de aminoacizi a peptidei. Peptida de legare a MHC-clasa I are de obicei o lungime de 8-12 resturi de aminoacizi și de obicei conține două resturi conservate ("ancore") în secvența lor care interacționează cu canalul de legare corespunzător al moleculei MHC. În acest fel, fiecare alelă MHC are un „motiv de legare” care determină ce peptidă se poate lega în mod specific la canalul de legare.

35 În reacția imună dependentă de MHC din clasa I, peptida nu numai că trebuie să se poată lega de anumite molecule de MHC de clasă I exprimate de celulele tumorale, ci ulterior trebuie să fie recunoscută și de celulele T care poartă receptori specifici pentru celulele T (TCR).

40 Pentru ca proteinele să fie recunoscute de limfocitele T ca antigeni specifici tumorii sau asociați și să fie utilizate într-o terapie, trebuie îndeplinite anumite condiții prealabile. Antigenul trebuie exprimat în principal de celulele tumorale și nu, sau în cantități relativ mici, de țesuturile normale sănătoase. Într-o variantă de realizare preferată, peptida ar trebui să fie supraprezentată de celulele tumorale în comparație cu țesuturile normale sănătoase. În plus, este de dorit ca antigenul respectiv să nu fie prezent doar într-un tip de tumoare, ci și în concentrații mari (*adică*, numărul de copii ale peptidei respective per celulă). Tumorile specifice și antigenii asociați tumorii sunt adesea derivați din proteine direct implicate în transformarea unei celule normale într-o celulă tumorală datorită funcției lor, de exemplu, în controlul ciclului celular sau suprimarea apoptozei. În plus, țintele din aval ale proteinei direct cauzatoare pentru o transformare pot fi reglate în sus și astfel pot fi asociate indirect cu tumora. Astfel de antigeni indirecte asociate tumorii pot fi, de asemenea, ținte ale unei abordări de vaccinare (Singh-Jasuja *și colab.*, 2004). Este esențial ca epitopii să fie prezenți în secvența de aminoacizi a antigenului, pentru a se asigura că o astfel de o peptidă („peptidă imunogenă”), fiind derivată dintr-un antigen asociat tumorii, conduce la un T- *in vitro* sau *in vivo*. celula-răspuns.

55 Prin urmare, TAA reprezintă un punct de plecare pentru dezvoltarea unei terapii bazate pe celule T, incluzând, însă fără a se limita la, vaccinuri tumorale. Metodele de identificare și caracterizare a TAA se bazează de obicei pe utilizarea celulelor T care pot fi izolate de la pacienți sau subiecți sănătoși, sau se bazează pe generarea de profiluri de transcripție diferențiate sau modele de expresie diferențială a peptidelor între tumori și țesuturi normale. Totuși, identificarea genelor supraexprimate în țesuturile

tumorale sau liniile celulare tumorale umane, sau exprimate selectiv în astfel de țesuturi sau linii celulare, nu oferă informații precise cu privire la utilizarea antigenilor transcriși din aceste gene într-o terapie imună. Acest lucru se datorează faptului că numai o subpopulație individuală de epitopi ai acestor antigeni este adecvată pentru o astfel de aplicație, întrucât o celulă T cu un TCR corespunzător trebuie să fie prezentă și toleranța imunologică pentru acest epitop particular trebuie să fie absentă sau minimă. Prin urmare, este important să se selecteze numai acele peptide prezentate în exces sau selectiv împotriva cărora poate fi găsită o celulă T funcțională și/sau proliferativă. O astfel de celulă T funcțională este definită ca o celulă T, care la stimularea cu un antigen specific poate fi expandată clonal și este capabilă să execute funcții efectoare ("celulă T efectoare").

În cazul țintirii peptidei-MHC de către TCR-uri specifice (de exemplu, TCR solubile) și anticorpi sau alte molecule de legare (schele) conform descrierii, imunogenitatea peptidei de bază este secundară. În aceste cazuri, prezentarea este factorul determinant.

În ciuda progresului semnificativ în cercetarea de bază și clinică privind TAA (Rosenberg și colab., *Nature Med.* 4: 321-7 (1998); Mukherji și colab., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8078-82 (1995); Hu și colab., *Cancer Res.* 56: 2479-83 (1996)), sunt disponibile doar un număr limitat de TAA candidați pentru tratamentul cancerului. TAA exprimați din abundență în celulele canceroase și, în același timp, expresia care este limitată la celulele canceroase ar fi candidați promițători ca ținte imunoterapeutice. Mai mult, identificarea de noi TAA care induc răspunsuri imune antitumorale puternice și specifice este de așteptat să încurajeze utilizarea clinică a strategiei de vaccinare cu peptide în diferite tipuri de cancer (Boon și van der Bruggen, *J. Exp. Med.* 183: 725-9 (1996); van der Bruggen și colab., *Science* 254: 1643-7 (1991); Brichard și colab., *J. Exp. Med.* 178: 489-95 (1993); Kawakami și colab., *J. Exp. Med.* 180: 347-52 (1994); Shichijo și colab., *J. Exp. Med.* 187: 277-88 (1998); Chen și colab., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1914-8 (1997); Harris, J., *Natl. Cancer Inst.* 88: 1442-5 (1996); Butterfield și colab., *Cancer Res.* 59: 3134-42 (1999); Vissers și colab., *Cancer Res.* 59: 5554-9 (1999) van der Burg și colab., *J. Immunol* 156: 3308-14 (1996); Tanaka și colab., *Cancer Res.* 57: 4465-8 (1997); Fujie și colab., *Int. J. Cancer* 80: 169-72 (1999); Kikuchi și colab., *Int. J. Cancer* 81: 459-66 (1999); Oiso și colab., *Int. J. Cancer* 81: 387-94 (1999)).

În plus, deși s-au făcut progrese în dezvoltarea medicamentelor de țintire moleculară pentru terapia cancerului, gamele de tipuri de tumori care răspund, precum și eficacitatea tratamentelor sunt încă foarte limitate. Prin urmare, este urgent să se dezvolte noi agenți anti-cancer care țintesc moleculele foarte specifice celulelor maligne și care sunt susceptibili de a provoca reacții adverse minime sau deloc. Există, de asemenea, necesitatea identificării factorilor reprezentând biomarkeri pentru cancer în general și NSCLC în special, care să conducă la o mai bună diagnosticare a cancerului, evaluarea prognosticului și predicția succesului tratamentului.

REZUMATUL INVENȚIEI

Scopul invenției este definit de revendicări.

În mod specific, prezenta invenție se referă la o peptidă constând dintr-o secvență amino a SECV ID NR. 1 (KVLEHVVRV), sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia, pentru utilizare în tratamentul cancerului, în care cancerul menționat este selectat dintre cancerul pulmonar fără celule mici și cancerul pulmonar cu celule mici.

Prezenta invenție se referă, în continuare, la 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 care ligandul menționat constă din peptida prezentei invenții, pentru utilizare în tratamentul cancerului pulmonar fără celule mici sau cancerului pulmonar cu celule mici.

Prezenta invenție se referă, în continuare, la un anticorp, în special un anticorp solubil sau legat de membrană, care recunoaște în mod specific peptida prezentei invenții atunci când este legată de o moleculă MHC pentru utilizare în tratamentul cancerului pulmonar fără celule mici sau cancerului pulmonar cu celule mici.

Prezenta invenție se referă, în continuare, la o compoziție farmaceutică care cuprinde cel puțin un ingredient activ selectat din grupul constând din peptida prezentei invenții, sau anticorpul prezentei invenții, sau receptorul de celule T al prezentei invenții, și un purtător acceptabil farmaceutic, și, opțional, excipienți și/sau stabilizatori acceptabili farmaceutic suplimentari pentru utilizare în tratamentul cancerului, în care cancerul menționat este selectat dintre cancerul pulmonar fără celule mici și cancerul pulmonar cu celule mici.

Prezenta descriere dezvăluie o peptidă care cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR:2 până la SECV ID NR:24 sau o secvență variantă a acesteia care este de cel puțin 65%, de preferință de cel puțin 77% și mai preferat de cel puțin 85% omoloagă (de preferință cel puțin 75% sau cel puțin 85% identică) cu SECV ID NR:2 până la SECV ID NR:24, în care respectiva variantă se leagă la MHC și/sau induce reticularea celulelor T cu peptida menționată, sau o sare

acceptabilă farmaceutic a acesteia, și în care peptida menționată nu este polipeptida de lungime completă subiacentă.

Dezvăluite aici este, de asemenea, o peptidă cuprinzând o secvență care este selectată din grupul constând din SECV ID NR:2 până la SECV ID NR:24 sau o variantă a acesteia, care este de cel puțin 65%, de preferință de cel puțin 75% și mai preferabil cel puțin 85% omoloagă (de preferință cel puțin 75% sau cel puțin 85% identică) cu SECV ID NR:2 până la SECV ID NR:24, în care respectiva peptidă sau varianta acesteia are o lungime totală cuprinsă între 8 și 100, de preferință între 8 și 30, și cel mai preferabil între 8 și 14 aminoacizi, în care respectiva peptidă sau varianta se leagă la MHC și/sau induce celulele T în reacții încrucișate cu respectiva peptidă, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia.

Următoarele tabele prezintă peptida conform prezentei descrieri și SECV ID NR. respective ale acestora. Prezenta invenție se referă la peptida cu SECV ID NR: 1. Peptidele cu SECV ID NR: Tabelul 1: Peptide conform prezentei descrieri. Prezenta invenție se referă la peptida cu SECV ID NR: 1. Peptidele cu SECV ID NR: 2 până la 24 sunt dezvăluite aici numai ca referințe.

SECV ID NR:	Secvența
1	KVLEHVVRV
2	KVLEHVVRVRL
3	KVLEHVVRVRA
4	KVLEHVVRVRI
5	KLLEHVVRV
6	KLLEHVVRVRL
7	KLLEHVVRVRA
8	KLLEHVVRVRI
9	KALEHVVRV
10	KALEHVVRVRL
11	KALEHVVRVRA
12	KALEHVVRVRI
13	YLLEHVVRV
14	YLLEHVVRVRL
15	YLLEHVVRVRA
16	YLLEHVVRVRI
17	YALEHVVRV
18	YALEHVVRVRL
19	YALEHVVRVRA
20	YALEHVVRVRI
21	YVLEHVVRV
22	YVLEHVVRVRL
23	YVLEHVVRVRA
24	YVLEHVVRVRI

Prezenta descriere dezvăluie variante ale peptidei MAG-003 (SECV ID NR:1), cuprinzând o secvență de aminoacizi conform următoarei formule generale I:

$X_1X_2LEHVVRX_3$

Formula I

în care X_1 este selectat dintre aminoacizii K și Y, X_2 este selectat dintre aminoacizii V, L și A, și X_3 este selectat dintre V, L, A, și I, în care respectiva peptidă se leagă la o moleculă HLA din clasa I sau II și/sau induce celulele T să reacționeze încrucișat cu respectivele peptide. As dezvăluite aici, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora. Așa cum se dezvăluie aici, respectiva peptidă nu este polipeptida de lungime completă subiacentă.

Peptida cu SECV ID NR: 1 a prezentei invenții este pertru utilizare în tratamentul cancerului pulmonar fără celule mici sau al cancerului pulmonar cu celule mici.

Prezenta descriere dezvăluie în plus variante ale peptidelor cu SECV ID NR: 1 pertru utilizare în tratamentul bolilor proliferative, cum ar fi cancerul pulmonar cu celule mici, cancerul pulmonar cu celule mici, cancerul celulelor renale, cancerul cerebral, cancerul gastric, cancerul colorectal, cancerul hepatocelular, cancerul pancreatic, cancerul de prostată, leucemia, cancerul de sân, carcinomul cu celule Merkel, melanomul, cancerul ovarian, cancerul vezicii urinare, cancerul uterin, cancerul vezicii biliare și al ductului biliar și cancerul esofagian.

Peptidele - singure sau în combinație - conform prezentei descrieri sunt selectate din grupul constând din SECV ID NR:2 până la SECV ID NR:24. Sunt dezvăluite aici peptide - singure sau în

combinație - selectate din grupul constând din SECV ID NR:2 până la SECV ID NR:24 (vezi Tabelul 1), și utilizările acestora în imunoterapia cancerului pulmonar fără celule mici, cancerului pulmonar cu celule mici, cancerului celulelor renale, cancerului cerebral, cancerului gastric, cancerului colorectal, cancerului hepatocelular, cancerului pancreatic, cancerului de prostată, leucemiei, cancerului de sân, carcinomului cu celule Merkel, melanomului, cancerului ovarian, cancerului vezicii urinare, cancerului uterin, cancerului vezicii biliare și al ductului biliar și a cancerului esofagian, și de preferință a glioblastomului, cancerului gastric, cancerului pulmonar, carcinomului hepatocelular, cancerului colorectal, cancerului pancreatic, cancerului esofagian, cancerului ovarian, și a cancerului pulmonar fără celule mici.

Sunt dezvăluite aici variante de peptide ale peptidei cu SECV ID NR: 1, care au the capacitatea de a se lega la o moleculă a complexului de histocompatibilitate majoră umană (MHC) clasa-I sau - într-o formă alungită, cum ar fi o variantă-de lungime - MHC clasa-II.

Sunt dezvăluite aici variante de peptide ale peptidei cu SECV ID NR: 1, în care respectivele peptide (fiecare) cuprind, constau din, sau constau în esență dintr-o secvență de aminoacizi conform SECV ID NR:2 până la SECV ID NR:24.

Sunt dezvăluite aici peptide, în care respectiva peptidă este modificată și/sau include legături non-peptidice.

Sunt dezvăluite aici peptide, în care respectiva peptidă face parte dintr-o proteină de fuziune, în special condensată cu aminoacizii N-terminali ai lanțului invariabil asociat antigenului HLA-DR (li), sau condensată cu (sau în secvența unui) un anticorp, cum ar fi, de exemplu, un anticorp care este specific pentru celulele dendritice.

Prezenta descriere dezvăluie un acid nucleic care codifică peptidele dezvăluite aici. Prezenta descriere dezvăluie în continuare acidul nucleic care este ADN, cADN, ANP, ARN sau combinații ale acestora.

Prezenta descriere dezvăluie în continuare un vector de expresie capabil să exprime și/sau care exprimă un acid nucleic dezvăluit aici.

Prezenta descriere dezvăluie în continuare o peptidă, un acid nucleic sau un vector de expresie pentru utilizare în tratamentul bolilor și în medicamente, în special în tratamentul cancerului.

Prezenta descriere dezvăluie în continuare anticorpi care sunt specifici împotriva peptidelor prezentei dezvăluirii sau complecși ai respectivelor peptide conform prezentei descrieri cu MHC, și procedee de producere a acestora.

Prezenta descriere dezvăluie în continuare o celulă gazdă cuprinzând un acid nucleic sau un vector de expresie așa cum se descrie aici.

Prezenta descriere dezvăluie în continuare respectiva celulă gazdă care este o celulă gazdă care prezintă un antigen, și de preferință este o celulă dendritică.

Prezenta descriere dezvăluie în continuare un procedeu de producere a unei peptide descrise aici, respectivul procedeu cuprinzând cultivarea celulei gazdă dezvăluite aici, și izolarea peptidei din respectiva celulă gazdă sau mediul său de cultură.

Prezenta descriere dezvăluie în continuare respectivul procedeu, în care antigenul este încărcat pe moleculele de MHC din clasa I sau II exprimate pe suprafața unei celule care prezintă antigenul adecvate sau celule care prezintă antigenul artificiale prin contactarea unei cantități suficiente de antigen cu o celulă care prezintă antigenul.

Prezenta descriere dezvăluie în continuare procedeul în care celula care prezintă antigenul cuprinde un vector de expresie capabil să exprime și/sau care exprimă respectiva peptidă containing SECV ID NR:1 până la SECV ID NR.: 24, preferabil conținând SECV ID NR:1 până la SECV ID NR:24, sau o variantă de secvență de aminoacizi.

Prezenta descriere dezvăluie în continuare celule T activate, produse prin procedeul dezvăluit aici, în care respectiva celulă T recunoaște selectiv o celulă descrisă aici care exprimă o polipeptidă cuprinzând o secvență de aminoacizi descrisă aici.

Prezenta descriere dezvăluie în continuare o metodă de ucidere a celulelor țintă la un pacient, celule țintă care exprimă aberant o polipeptidă cuprinzând orice secvență de aminoacizi dezvăluită aici, metoda cuprinzând administrarea, așa cum s-a descris aici, pacientului a unui număr eficient de celule T produse așa cum s-a descris aici.

Este, de asemenea, dezvăluită aici utilizarea oricărei peptide, acid nucleic, vector de expresie, celulă, limfocită T activată, receptor al celulelor T sau alte molecule de legare la peptidă și/sau de legare la peptidă-MHC așa cum se descrie aici ca medicament sau la fabricarea unui medicament. Respectivul medicament poate fi activ împotriva cancerului.

Respectivul medicament poate fi o terapie celulară, un vaccin sau o proteină bazată pe un TCR solubil sau anticorp.

Prezenta descriere dezvăluie în continuare o utilizare așa cum se descrie aici, în care respectivele celule canceroase sunt cancer fără celule mici, cancer cu celule mici, cancer al celulelor renale, cancer cerebral, cancer gastric, cancer colorectal, cancer hepatocelular, cancer pancreatic, cancer de prostată, leucemie, cancer de sân, carcinom cu celule Merkel, melanom, cancer ovarian, cancer al vezicii urinare, cancer uterin, cancer al vezicii biliare și al ductului biliar și cancer esofagian, și de preferință cancer fără celule mici.

Sunt, de asemenea, dezvăluiți aici biomarkeri bazați pe peptidele descrise aici la care se va face referire ca "ținte" care se pot utiliza în diagnosticarea cancerului, de preferință, a cancerului pulmonar fără celule mici. Markerul poate fi o supra-prezentare a peptidei/peptidelor însăși/insele, sau supra-expresie a genei/genelor corespunzătoare. Markerii se pot utiliza, de asemenea, pentru a prezice probabilitatea de succes a tratamentului, de preferință, o imunoterapie, și cel mai preferat o imunoterapie care țintește aceeași țintă care este identică cu biomarkerul. De exemplu, un anticorp sau TCR solubil se pot utiliza pentru a colora secțiunile tumorii cu scopul de a detecta prezența unei peptide de interes în complexul cu MHC. Opțional, anticorpusul poartă o altă funcție efectoare cum ar fi un domeniu de stimulare imunitară sau toxină.

Este, de asemenea, dezvăluită aici utilizarea acestor noi ținte pentru identificarea TCR care recunosc cel puțin una dintre respectivele ținte și de preferință identificarea of respectivilor TCR care activează celulele T.

Prezenta descriere dezvăluie, de asemenea, utilizarea acestor noi ținte în contextul tratamentului cancerului.

Prezenta descriere dezvăluie în continuare utilizarea peptidelor descrise aici pentru producerea TCR, subunităților de TCR individuale (singure sau în combinație), și sub-domeniilor acestora, în special TCR solubili (sTCR) și TCR clonați, respectivii TCR modificați genetic în celule T autoloage sau alogene, și metode de producere a acestora, precum și a altor celule care poartă respectivul TCR sau reacționează încrucișat cu respectivii TCR.

Prezenta invenție se referă la o proteină a TCR, subunitățile de TCR individuale (singure sau în combinație), și sub-domeniile acestora, în special TCR solubili (sTCR) și TCR clonați care se leagă la un complex KVLEHVVRV (SECV ID NR:1)-HLA-A*02 cuprinzând un domeniu variabil al lanțului alfa al TCR un domeniu variabil al lanțului beta al TCR pentru utilizare în tratamentul cancerului pulmonar fără celule mici sau al cancerului pulmonar cu celule mici.

Prezenta invenție se referă, în continuare, la un acid nucleic izolat cuprinzând o secvență de nucleotidă care codifică un TCR al prezentei invenții. Prezenta invenție se referă, în continuare, la un vector de expresie recombinant cuprinzând un acid nucleic care codifică un lanț alfa, lanț beta, al TCR, sau ambele, produs conform prezentei descrieri.

Prezenta descriere dezvăluie, de asemenea, o celulă gazdă izolată cuprinzând vectorul de expresie recombinant care exprimă acidul nucleic care codifică lanțul alfa, lanțul beta, al TCR, sau ambele.

De asemenea, este dezvăluită aici o celulă gazdă izolată cuprinzând vectorul de expresie recombinant al prezentei invenții, de preferință, în care celula este o limfocită din sângele periferic (PBL).

De asemenea, este dezvăluită aici o PBL izolată cuprinzând vectorul de expresie recombinant al prezentei invenții, în care PBL este o celulă T CD8+ sau o CD4+ celulă T.

De asemenea, este dezvăluită aici o populație de celule cuprinzând cel puțin o celulă gazdă a prezentei descrieri.

Prezenta invenție se referă, în continuare, la proteine ale TCR ale prezentei invenții pentru utilizare în tratamentul cancerului pulmonar fără celule mici și al cancerului pulmonar cu celule mici. Sunt, de asemenea, dezvăluite aici respectivele proteine ale TCR pentru utilizare în tratamentul cancerului celulelor renale, cancerului cerebral, cancerului gastric, cancerului colorectal, cancerului hepatocelular, cancerului pancreatic, cancerului de prostată, leucemiei, cancerului de sân, carcinomului cu celule Merkel, melanomului, cancerului ovarian, cancerului vezicii urinare, cancerului uterin, cancerului vezicii biliare și al ductului biliar și al cancerului esofagian.

Stimularea unui răspuns imun depinde de prezența antigenilor recunoscuți ca străni de sistemul imunitar al gazdei. Descoperirea existenței antigenilor asociați tumorilor a ridicat posibilitatea de utilizare a sistemului imunitar al gazdei de a interveni în creșterea tumorii. Pentru imunoterapia cancerului sunt explorate în prezent diverse mecanisme de explorare atât a brațelor umorale cât și a celor celulare ale sistemului imunitar.

Elementele specifice ale răspunsului imun celular sunt capabile să recunoască specific și să distrugă celulele tumorale. Izolarea celulelor T din populațiile de celule care infiltrază tumoarea sau din sângele periferic sugerează faptul că astfel de celule joacă un rol important în apărarea imună naturală împotriva cancerului. Celulele T pozitive la CD8 în special, care recunosc moleculele din clasa I ale

peptidelor care poartă complexul (MHC) cu histocompatibilitate majoră de obicei cu 8 până la 10 resturi de aminoacizi derivate din proteine sau produși ribozomici defectuoși (DRIPS) localizați în citozol, joacă un rol important în acest răspuns. Moleculele de MHC ale omului sunt, de asemenea, desemnate ca antigeni leucocitari umani (HLA).

Termenul "răspuns al celulei T" înseamnă proliferarea specifică și activarea funcțiilor efectoare induse de o peptidă *in vitro* sau *in vivo*. Pentru MHC din clasa I celulele T citotoxice restrictive, funcțiile efectoare poate fi liza a celulelor țintă care prezintă peptide pulsate, precursori ai peptidelor pulsate sau peptide naturale, secreția citokinelor, de preferință Interferonul-gama, TNF-alfa, sau IL-2 indusă de peptide, secreția moleculelor efectoare, de preferință, granzime sau perforine induse de peptide, sau degranulare.

Termenul "peptidă" se utilizează aici pentru a desemna o serie de resturi de aminoacizi, conectate unele cu altele, în mod obișnuit, prin legături peptidice între grupările alfa/amino și carbonil ale aminoacizilor adiacenți. Peptidele au, de preferință, 9 aminoacizi în lungime, însă pot avea și 8 aminoacizi în lungime, și 10, 11, sau 12 sau mai lungi, și în cazul peptidelor MHC din clasa II (variantele alungite ale peptidelor din descriere) acestea pot avea 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 sau 20 sau mai mulți aminoacizi în lungime.

În plus, termenul "peptide" va include săruri ale unei săruri de resturi de aminoacizi, conectate unele cu altele, în mod obișnuit, prin legături peptidice între grupările alfa/amino și carbonil ale aminoacizilor adiacenți. De preferință, sărurile sunt săruri acceptabile farmaceutic ale peptidelor, cum ar fi, de exemplu, sărurile clorură sau acetat (trifluoro-acetat). Trebuie remarcat faptul că sărurile peptidelor conform prezentei descrieri diferă substanțial de peptidele în stările lor *in vivo*, întrucât peptidele nu sunt săruri *in vivo*.

Termenul "peptide" va include, de asemenea, "oligopeptide". Termenul "oligopeptide" se utilizează aici pentru a desemna o serie de resturi de aminoacizi, conectate unele cu altele, în mod obișnuit, prin legături peptidice între grupările alfa/amino și carbonil ale aminoacizilor adiacenți. Lungimea oligopeptidelor nu este critică pentru descriere, atâta timp cât epitopul sau epitopii sunt menținuți în acestea. Oligopeptidele au în mod obișnuit mai puțin de aproximativ 30 de resturi de aminoacizi în lungime, și mai mari de aproximativ 15 aminoacizi în lungime.

Termenul "polipeptidă" desemnează o serie de resturi de aminoacizi, conectate unele cu altele, în mod obișnuit, prin legături peptidice între grupările alfa/amino și carbonil ale aminoacizilor adiacenți. Lungimea polipeptidei nu este critică pentru descriere atâta timp cât epitopii corecți sunt menținuți. În contrast cu termenii peptidă sau oligopeptidă, termenul polipeptidă este menit să se refere la moleculele conținând peste aproximativ 30 de resturi de aminoacizi.

O peptidă, oligopeptidă, proteină sau polinucleotidă care codifică o astfel de moleculă este "imunogenică" (și astfel este "imunogenă" în prezenta descriere), dacă este capabilă să inducă un răspuns imun. În cazul prezentei descrieri, imunogenicitatea este definită mai specific drept capacitatea de a induce un răspuns al celulei T. Astfel, un "imunogen" ar fi o moleculă care este capabilă să inducă un răspuns imun, și în cazul prezentei descrieri, o moleculă capabilă să inducă un răspuns al celulei T. Într-un alt aspect, imunogenul poate fi peptidă, complex de peptide cu MHC, oligopeptidă, și/sau proteină care se utilizează pentru a crește anticorpi specifici sau TCR împotriva acestora.

Un "epitop" ale celulei T din clasa I necesită o peptidă scurtă care este legat la un receptor MHC din clasa I, formând un complex teARNry (lanț alfa al MHC din clasa I, beta-2-microglobulină, și peptidă) care poate fi recunoscut de o celulă T care poartă un potrivit receptor al celulei T care se leagă la complexul MHC/peptidă cu afinitate corespunzătoare. Peptidele care se leagă la moleculele de MHC din clasa I au în mod obișnuit 8-14 aminoacizi în lungime, cel mai tipic 9 aminoacizi în lungime.

La oameni există trei loci diferiți genetic care codifică moleculele de MHC din clasa I (moleculele de MHC ale omului sunt, de asemenea, desemnate ca antigeni leucocitari umani (HLA)): HLA-A, HLA-B, și HLA-C. HLA-A*01, HLA-A*02, și HLA-B*07 sunt exemple de diferite alele ale MHC din clasa I care pot fi exprimate din acești loci.

Tabelul 2: Frecvențele de expresie F ale HLA-A*02 și HLA-A*24 și cele mai frecvente serotipuri HLA-DR. Frecvențele sunt deduse din frecvențele halotipului Gf din populația americană adaptate de Mori și colab. (Mori și colab., 1997) prin utilizarea formulei Hardy-Weinberg $F = 1 - (1 - Gf)^2$. Combinațiile A*02 sau A*24 cu anumite alele HLA-DR pot fi îmbunătățite sau mai puțin frecvente decât este de așteptat din frecvențele lor unice din cauza dezechilibrului de legătură. Pentru detalii se poate consulta Chanock și colab. (Chanock și colab., 2004).

Alela	Populația	Fenotip calculat din frecvența alelei
A*02	Caucasiană (America de Nord)	49,1%
A*02	Afro-americană (America de Nord)	34,1%

A*02	Asiatic americană (America de Nord)	43,2%
A*02	Latino-americană (America de Nord)	48,3%
DR1	Caucaziană (America de Nord)	19,4%
DR2	Caucaziană (America de Nord)	28,2%
DR3	Caucaziană (America de Nord)	20,6%
DR4	Caucaziană (America de Nord)	30,7%
DR5	Caucaziană (America de Nord)	23,3%
DR6	Caucaziană (America de Nord)	24,8%
DR7	Caucaziană (America de Nord)	26,7%
DR8	Caucaziană (America de Nord)	5,7%
DR9	Caucaziană (America de Nord)	2,1%
DR1	Africană (Nord) Americană	13,20%
DR2	Africană (Nord) Americană	29,80%
DR3	Africană (Nord) Americană	24,80%
DR4	Africană (Nord) Americană	11,10%
DR5	Africană (Nord) Americană	31,10%
DR6	Africană (Nord) Americană	33,70%
DR7	Africană (Nord) Americană	19,20%
DR8	Africană (Nord) Americană	12,10%
DR9	Africană (Nord) Americană	5,80%
DR1	Asiatică (Nord) Americană	6,80%
DR2	Asiatică (Nord) Americană	33,80%
DR3	Asiatică (Nord) Americană	9,20%
DR4	Asiatică (Nord) Americană	28,60%
DR5	Asiatică (Nord) Americană	30,00%
DR6	Asiatică (Nord) Americană	25,10%
DR7	Asiatică (Nord) Americană	13,40%
DR8	Asiatică (Nord) Americană	12,70%
DR9	Asiatică (Nord) Americană	18,60%
DR1	Latină (Nord) Americană	15,30%
DR2	Latină (Nord) Americană	21,20%
DR3	Latină (Nord) Americană	15,20%
DR4	Latină (Nord) Americană	36,80%
DR5	Latină (Nord) Americană	20,00%
DR6	Latină (Nord) Americană	31,10%
DR7	Latină (Nord) Americană	20,20%
DR8	Latină (Nord) Americană	18,60%
DR9	Latină (Nord) Americană	2,10%
A*24	Filipineză	65%
A*24	Neneți din Rusia	61%
A*24:02	Japoneză	59%
A*24	Malaeziană	58%
A*24:02	Filipineză	54%
A*24	Indiană	47%
A*24	Sud coreană	40%
A*24	Sri Lankeză	37%
A*24	Chineză	32%
A*24:02	Indiană	29%
A*24	Vest australiană	22%
A*24	USA	22%
A*24	Samara Rusia	20%
A*24	Sud americană	20%
A*24	Europeană	18%

Gena MAGEA4 este un membru al familiei de gene MAGEA. Membrii acestei familii codifică proteine cu 50 până la 80% identitate a secvenței una față de cealaltă. Promotorii și primii axoni ai genelor MAGEA prezintă variabilitate considerabilă, sugerând faptul că existența acestei familii de gene

permite ca aceeași funcție să fie exprimată sub diferite controale transcripționale. Genele MAGEA sunt grupate la locația cromozomială Xq28. Acestea au fost implicate în unele tulburări ereditare, cum ar fi diskertoza congenitală. Cel puțin patru variante care codifică aceeași proteină s-au găsit pentru această genă. [oferite de RefSeq, iulie 2008]

Localizarea MAGEA4 a fost descrisă ca citoplasmatică (Kim *și colab.*, 2015). Totuși, colorarea MAGEA4 a fost detectată, de asemenea, în nucleu, cu distribuție diferențială între nucleu și citoplasmă în cancerele bine diferențiate față de cele mai puțin diferențiate (Sarcevic *și colab.*, 2003).

MAGEA4 se utilizează ca marker de celule germinale masculine. Aceasta nu este exprimată în gonocite, însă este exprimată în pre-spermatogonie și celulele germinale mature (Mitchell *și colab.*, 2014).

MAGEA4 este o proteină oncofetală sau antigen testicular al cancerului. Nu există nicio dovadă evidentă pentru un efect direct de promovare a tumorii al MAGEA4. Un studiu sugerează faptul că supra-exprimarea MAGEA4 promovează creșterea keratinocitelor orale normale transformate spontan prin inhibarea opririi ciclului celular și a apoptozei (Bhan *și colab.*, 2012). Totuși, alte rapoarte sugerează un efect de suprimare a tumorii al MAGEA4 *in vitro*, întrucât supra-exprimarea a crescut apoptoza și activitatea capsazei-3, în timp ce silențierea MAGEA4 a avut ca rezultat scăderea activității capsazei-3 (Peikert *și colab.*, 2006). Alții au raportat faptul că un fragment C-terminal al MAGEA4 are activitate pro-apoptotică *in vitro* (Sakurai *și colab.*, 2004) și că acesta inhibă creșterea independentă de ancorare prin interacția sa cu gankirina oncoproteinei (Nagao *și colab.*, 2003).

Există dovezi sporadice pentru o asociere cu metastaza tumorală: expresia MAGEA4 a fost asociată cu metastaza ganglionilor limfatici în carcinomul esofagian cu celule scuamoase (Forghanifard *și colab.*, 2011), cu progresie la cancerul invaziv muscular în cancerul vezicii urinare (Bergeron *și colab.*, 2009), și cu metastaze ganglionare în cancerul vulvar (Bellati *și colab.*, 2007).

Nu există nicio dovadă evidentă pentru asocierea MAGEA4 cu celulele stem asemănătoare cancerului. Cu toate acestea, expresia MAGEA4 a fost detectată în celulele secundare ale populației din diferite linii de celule canceroase, inclusiv plămâni, colon și sân (Yamada *și colab.*, 2013), precum și în probele de tumori de limfom Hodgkin (Shafer *și colab.*, 2010). Mai mult, MAGEA4 a fost descris în celule stem embrionare umane nediferențiate, precum și în derivații lor diferențiați, celule de teratocarcinom (Lifantseva *și colab.*, 2011).

Supraexpresia MAGEA4 în cancer - expresia MAGEA4 a fost descrisă într-o multitudine de tipuri diferite de cancer. Pentru detalii despre anumite entități canceroase, consultați subsecțiunile de mai jos. Aici sunt enumerate doar câteva informații suplimentare despre tipurile de cancer care nu sunt acoperite de o secțiune specifică de mai jos.

În melanomul primar, expresia MAGEA4 a fost detectată prin imunohistochimie în 10-30% din tumori și până la 44% în metastazele la distanță (Barrow *și colab.*, 2006; Luftl *și colab.*, 2004). Melanoamele primare ale mucoasei capului și gâtului au prezentat o pozitivitate de până la 60% pentru colorarea MAGEA4 (Prasad *și colab.*, 2004).

În cancerul vezicii urinare, MAGEA4 a fost observat în 38% dintre tumorile non-invazive musculare, 48% dintre tumorile invazive musculare, 65% din carcinoamele *in situ* și în 73% dintre metastazele ganglionilor limfatici (Bergeron *și colab.*, 2009). Un alt studiu a descris expresia MAGEA4 în cancerul vezicii urinare cu frecvențe oarecum mai scăzute, cu frecvențele cele mai mari în scuamoase (25/55, 46%) în comparație cu adeno (4/15, 27%), sarcomatoid (4/14, 29%), carcinoame cu celule mici (5/20, 25%) sau cu celule de tranziție (281/1522, 19%) (Kocher *și colab.*, 2002). În carcinomul urotelial, expresia MAGEA4 a fost detectată prin imunohistochimie în 64% și prin RT-PCR în 58% din cazuri (Sharma *și colab.*, 2006). MAGEA4 a fost detectat prin RT-PCR în 40 - 60% din probele de carcinom cu celule scuamoase ale capului și gâtului (Cuffel *și colab.*, 2011; Soga *și colab.*, 2013). Expresia MAGEA4 a fost detectată în 57% din probele de carcinom cu celule scuamoase orale (Montoro *și colab.*, 2012; Ries *și colab.*, 2005). Expresia MAGEA4 nu a fost detectată prin imunohistochimie în niciuna dintre cele 70 de probe de tumori tiroidiene benigne și maligne analizate (Melo *și colab.*, 2011). Expresia MAGEA4 a fost găsită doar în seminomul clasic, dar nu și în tumorile cu celule germinale testiculare non-seminomatoase (Aubry *și colab.*, 2001; Bode *și colab.*, 2014). Expresia MAGEA4 a fost detectată în 14% (5/35) dintre tumorile stomale gastrointestinale (Perez *și colab.*, 2008).

În meduloblastomul copilăriei, ARNm al MAGEA4 a fost detectat în 28% (7/25), dar imunoreactivitatea a fost observată doar în 4% (1/25) din probe (Oba-Shinjo *și colab.*, 2008). Un alt studiu a găsit ARNm al MAGEA4 slab în 18% (2/11) dintre meduloblastoame (Jacobs *și colab.*, 2008).

Un studiu a constatat că MAGEA4 este exprimat în 60% din probele de leucemie/limfom cu celule T pentru adulți (Nishikawa *și colab.*, 2012). Un alt raport a descris frecvențe de exprimare mult mai scăzute în 5% (2/38) din probele de limfom non-Hodgkin și 20-30% din probele de boala Hodgkin. În limfomul Hodgkin, celulele Reed-Sternberg au fost celulele cel mai puternic colorate, în timp ce

celulele din jur nu au fost (Chambost *și colab.*, 2000). Expresia MAGEA4 nu a fost detectată în 39 de probe de mielom multiplu (Andrade *și colab.*, 2008).

Imunoreactivitatea MAGEA4 a fost detectabilă în 33% din carcinoamele cu celule scuamoase cervicale (20/60) (Sarcevic *și colab.*, 2003).

Prin imunohistochimie, s-a constatat că expresia MAGEA4 este prezentă în 12% din adenocarcinoamele endometriale, 63% din carcinoamele seroase papilare uterine și 91% din carcinosarcoamele uterine. În cadrul populației tumorale, gradul de exprimare a MAGEA4 a fost cel mai mare în carcinosarcoame (Resnick *și colab.*, 2002).

Colorarea MAGEA4, așa cum este detectată prin imunohistochimie, este eterogenă și doar o fracțiune din tumorile pozitive exprimă MAGEA4 în mai mult de 50% din celulele tumorale (Resnick *și colab.*, 2002; Sarcevic *și colab.*, 2003).

Spre deosebire de numărul mare de studii care raportează expresia MAGEA4 în diferite tipuri de cancer, dovezile pentru asocierea MAGEA4 cu rezultatul și prognosticul sunt mai limitate. Cu toate acestea, unele rapoarte constată o corelație a expresiei MAGEA4 cu parametrii clinici. În carcinomul cu celule scuamoase de cap și gât, expresia MAGEA4 a fost corelată cu supraviețuirea globală slabă și a fost un indicator de prognostic independent al rezultatului slab (Cuffel *și colab.*, 2011). În cancerul vezicii urinare, expresia MAGEA4 a fost corelată cu recurența și progresia către cancerul invaziv muscular (Bergeron *și colab.*, 2009), iar colorarea puternică a MAGEA4 a fost asociată cu scăderea supraviețuirii (Kocher *și colab.*, 2002). În tumorile stromale gastrointestinale, expresia MAGEA4 împreună cu alți antigeni testiculari canceroși a fost corelată cu recurența (Perez *și colab.*, 2008), iar, de asemenea, în cancerul vulvar, MAGEA4 a fost detectat mai frecvent în tumorile recurente (Bellati *și colab.*, 2007).

Dovezile pentru asocierea expresiei MAGEA4 cu stadiile tumorale avansate sunt furnizate de unele rapoarte care acoperă diferite tipuri de cancer: în melanomul malign, expresia MAGEA4 a crescut odată cu evoluția bolii de la 9% în tumorile primare la 44% în metastazele la distanță (Barrow *și colab.*, 2006). De asemenea, în cancerul vulvar, expresia MAGEA4 a fost mai frecventă în tumorile cu metastaze ganglionare (Bellati *și colab.*, 2007). Mai mult, expresia MAGEA4 a fost asociată cu tumori de grad înalt sau stadiu avansat în carcinomul endometrial (Chitale *și colab.*, 2005), carcinoamele cu celule scuamoase cervicale (Sarcevic *și colab.*, 2003) și cancerul vezicii urinare (Bergeron *și colab.*, 2009); Kocher *și colab.*, 2002).

MAGEA4 pare să fie exprimat de celulele tumorale, nu există dovezi pentru exprimarea în celule stromale, vasculare, imune sau alte celule asociate tumorii. Mai mult, expresia MAGEA4 a fost detectată și în liniile celulare tumorale cultivate, cum ar fi liniile celulare de cancer gastric (Li *și colab.*, 1997), liniile celulare de carcinom esofagian (Tanaka *și colab.*, 1997), liniile celulare de carcinom pancreatic (Kubuschok *și colab.*, 2004) și liniile celulare de carcinom cu celule scuamoase ale capului și gâtului (Hartmann *și colab.*, 2015).

Tabelul 3: MAGEA4 ca țintă în cancerul general

Proprietăți antigen	Evaluare
Supraexpresia în [cancerul de interes] raportat în literatură	
Supraexpresia în alte cancere raportate în literatură	+
Răspunsurile celulelor T la țintele derivate din proteinele sursă descrise	+
Modelul de expresie oncofetală	+
Expresie prin celule stem canceroase	(-)
Roluri în progresul ciclului celular și al proliferării celulelor tumorale	(-)
Implicare în invazia tumorală, migrare și metastază	
Legătură cu căile de semnalizare asociate cancerului ¹	
Efecte anti-apoptotice	(-)
Efecte pro-angiogenice/Neovascularizare	
Supra-expresie legată de un prognostic slab în cancer	+
Supraexpresia asociată cu stadiile avansate de cancer	+
Țintă cancer general	
Localizare sub-celulară ²	CY
Caracterizarea proteinei sursă în literatură (-, +, ++, +++)	+
Asocierea tipului de celule ³	TU

¹ TGF = factor de creștere transformator; PI3K = Fosfatidilinozitol 3-kinaze; p53 = antigen tumoral celular p53; EGFR = receptorul factorului de creștere epitelial; FGF2 = factor de creștere fibroblast 2; Wnt = Wnt/calea beta-cateninei (embriogenează); Ras = proto-oncogenă sarcom de șobolan; NF-kB = factor nuclear Kappa B (factor de transcripție eucariotic) ² CY = citoplasmatic; ³TU = celule tumorale

MAGEA4 ca țintă terapeutică - țintă de imunoterapie (vaccinuri, adjuvanți, CAR). Douăzeci de pacienți cu cancer esofagian, stomacal sau pulmonar în stadiu avansat au primit vaccinul MAGEA4 care conținea 300 mg proteină subcutanat o dată la 2 săptămâni în șase doze. Din cei 15 pacienți care au finalizat un ciclu de vaccinare, patru pacienți au prezentat un răspuns umoral specific MAGEA4, iar acești pacienți au prezentat o supraviețuire globală mai lungă decât pacienții fără răspuns cu anticorpi. Răspunsurile celulelor CD4 și CD8T au fost observate la trei și, respectiv, șase pacienți, iar pacienții cu inducția celulelor CD8T producătoare de IFN γ MAGEA4-specific, dar nu celulele CD4T, au trăit mai mult decât cei fără inducție (Saito *și colab.*, 2014).

Există un raport de caz la un pacient cu cancer de colon cu metastaze pulmonare care a fost tratat cu peptida de fuziune MAGE-A4-H/K-HELP (constând din epitop auxiliar MAGE-A4(278-299) fuzionat cu MAGE-A4. (143-154) epitop ucigaș de către un linker de glicină) împreună cu OK432 și Montanide. Tratamentul a indus răspunsuri imune Th1 și CTL specifice MAGEA4 și IgG specifice MAGEA4. Creșterea tumorii și markerul tumoral al antigenului carcinoembrionar au fost scăzute în diagnosticul final (Takahashi *și colab.*, 2012).

Un studiu clinic de fază I a investigat transferul adoptiv al CTL-urilor autologe realizate prin inginerie TCR, reactive față de MAGEA4 (143-151) legate de HLA-A*24:02 la pacienții cu cancer esofagian. Pacienților li s-au administrat limfocite transduse cu TCR o dată, fără tratament de preconditionare, urmate de imunizări subcutanate cu peptidă MAGEA4 după 2 și 4 săptămâni. Nu a fost observată nicio regresie obiectivă a tumorii, posibil din cauza lipsei regimului de limfodepleție și a administrării de IL2 (Kageyama *și colab.*, 2015). Studiile preclinice la șoareci au demonstrat că celulele T transferate inhibă creșterea liniilor de celule tumorale care exprimă MAGEA4 inoculate la șoareci și că vaccinarea suplimentară cu peptide a îmbunătățit această activitate antitumorală (Shirakura *și colab.*, 2012).

Țintirea MAGEA4 cu transfer adoptiv de CTL este propusă ca o opțiune de tratament a limfomului Hodgkin EBV negativ și non-Hodgkin. CTL-urile perfuzate care vizează peptidele derivate din EBV au fost descrise pentru a induce remisii complete la pacienții cu limfom EBV(+). Prin urmare, țintirea altor antigeni exprimați de limfom, inclusiv MAGEA4, este explorată ca o posibilă opțiune de tratament (Cruz *și colab.*, 2011; Gerdemann *și colab.*, 2011).

Mai multe studii au demonstrat generarea de celule T CD4(+) specifice MAGEA4 de la donatori sănătoși și pacienți cu cancer după incubarea cu celule prezentatoare de antigen autologe pulsate cu pool-uri de peptide suprapuse (Cesson *și colab.*, 2011; Gerdemann *și colab.*, 2011; Ohkuri *și colab.*, 2009).

MAG-003, adică KVLEHVVRV (SECV ID NR:1), este un epitop de limfocite T citotoxice HLA-A*0201 restricționate (CTL) al MAGEA4 (aminoacizi 286-294). (Jia *și colab.* 2010; Wu *și colab.* 2011). Într-un aspect, MAG-003 provoacă CTL-uri specifice peptidei atât *in vitro* din PBMC-uri HLA-A* 0201-pozitive, cât și la șoarecii transgenici LA-A* 0201/Kb. Într-un alt aspect, CTL-urile induse lizează celulele țintă într-o manieră restricționată cu HLA-A* 0201, demonstrând că MAG-003 este epitop CTL restricționat cu HLA-A* 0201 și servește ca țintă pentru vaccinarea terapeutică antitumorală (Jia *și colab.* 2010).

În plus, rutina SYFPEITHI (Rammensee *și colab.*, 1997; Rammensee *și colab.*, 1999) prezice legarea MAG-003 la A*02:01 cu un scor absolut de 25 și un scor relativ de 0,69. Inventatorii prezenți au confirmat faptul că 100 % din identificări sunt de la legarea MAG-003 la probele A*02-pozitive.

Tabelul 4: Prezentarea MAG-003 în țesuturile normale și cancer.

A*02	Probe	Intensitate medie	Scor J
Normal	0 din 245	---	--
Cancer	14 din 397	1,1e+07	0,000
HCC	1 din 16	2,9e+06	0,000
MEL	0 din 3	0,0e+00	
PC	2 din 20	4,0e+07	0,000
pNSCLC	11 din 91	1,0e+07	0,000

Supraprezentarea sau prezentarea specifică a TAA pe celulele tumorale în comparație cu celulele normale este suficientă pentru utilitatea sa în imunoterapie, iar unele peptide sunt specifice tumorii în ciuda faptului că proteina lor sursă apare și în țesuturile normale. Cu toate acestea, profilarea expresiei ARNm adaugă un nivel suplimentar de siguranță în selecția țintelor peptidice pentru imunoterapii. În special pentru opțiunile terapeutice cu riscuri mari de siguranță, cum ar fi TCR-urile maturate cu afinitate, peptida țintă ideală va fi derivată dintr-o proteină care este unică pentru tumoră și nu se găsește pe țesuturile normale.

Specimenele de țesut îndepărtate chirurgical au fost furnizate, așa cum s-a indicat mai sus, după ce s-a obținut consimțământul informat scris de la fiecare pacient. Probele de țesut tumoral au fost

congelate imediat după operație și ulterior omogenizate cu mojar și pistil sub azot lichid. ARN-ul total a fost preparat din aceste probe utilizând reactiv TRI (Ambion, Darmstadt, Germania) urmat de o curățare cu RNeasy (QIAGEN, Hilden, Germania); ambele metode au fost efectuate conform protocolului producătorului.

- 5 Analiza expresiei genice a probelor de ARN tumoral și de țesut normal a fost efectuată prin secvențierea de generație următoare (RNAseq) de către CeGaT (Tübingen, Germania). Pe scurt, bibliotecile de secvențiere sunt preparate utilizând kitul de reactivi Illumina HiSeq v4 conform protocolului furnizorului (Illumina Inc., San Diego, CA, SUA), care include fragmentarea ARN, conversia cADN și adăugarea adaptoarelor de secvențiere. Bibliotecile derivate din mai multe eșantioane
- 10 sunt amestecate echimolar și secvențiate pe secvențiatorul Illumina HiSeq 2500 conform instrucțiunilor producătorului, generând citiri cu un singur capăt de 50 bp. Citirile procesate sunt mapate la genomul uman (GRCh38) utilizând software-ul STAR. Datele de expresie sunt furnizate la nivel de transcriere ca RPKM (Reads Per Kilobase per Million mapped reads, generate de software-ul Cufflinks) și la nivel de exon (total citiri, generate de software-ul Bedtools), pe baza adnotărilor din baza de date a secvenței de ansamblu (Ensembl77). Citirile exonului sunt normalizate pentru lungimea exonului și dimensiunea de aliniere pentru a obține valori RPKM.
- 15

Tabelele 5 până la 7 arată datele RNASeq (scoruri de expresie) ale expresiei MAG-003 în diferite tipuri de cancer.

Tabelul 5: Prezentarea MAG-003 în țesuturi normale și cancere

Tip tumoră	Scor tg	Scor exon (27242)	Scor exon (317034)	Scor exon (593984)
BRCA	1,57	1,23	1,23	1,51
CRC	1,65	1,00	1,00	1,76
HCC	12,10	11,98	11,97	6,15
OC	56,60	18,45	18,44	57,74
OSCAR	58,42	3,49	3,49	60,40
PC	12,10	10,78	10,77	4,74
pGB	0,88	0,95	0,95	0,74
pNSCLC	100,83	1,52	1,52	98,57
RCC	0,93	0,95	0,95	0,77
SCLC	56,41	28,32	28,30	152,27

20

Tabelul 6: Scor ARNseq 3

Tip tumoră	Scor tg	Scor exon (27242)	Scor exon (317034)	Scor exon (593984)
BRCA	7,48	5,11	5,11	6,01
CRC	8,35	1,05	1,05	7,90
HCC	123,03	210,33	210,30	42,22
OC	612,59	333,74	333,69	447,29
OSCAR	632,95	47,41	47,40	468,45
PC	122,95	187,07	187,05	31,15
pGB	0,31	0,18	0,18	0,25
pNSCLC	1100,05	10,26	10,25	768,23
RCC	0,78	0,18	0,18	0,43
SCLC	611,00	524,23	524,17	1190,36

Tabelul 7: Expresia tumorii

Tip tumoră	tumoră tg40	Tumoră exon40 (27242)	Tumoră exon40 (317034)	Tumoră exon40 (593984)
BRCA	0,12	0,04	0,04	0,17
CRC	0,14	0,01	0,01	0,22
HCC	2,05	1,82	1,82	1,18
OC	11,19	3,16	3,16	13,72
OSCAR	10,89	0,42	0,42	13,11
PC	2,09	1,65	1,65	0,89
pGB	0,00	0,00	0,00	0,01

pNSCLC	19,25	0,09	0,09	22,58
RCC	0,01	0,00	0,00	0,01
SCLC	10,18	4,53	4,53	33,35

Spre deosebire de numărul mare de studii care raportează expresia MAGEA4 în diferite tipuri de cancer, dovezile pentru asocierea MAGEA4 cu rezultatul și prognosticul sunt mai limitate. Cu toate acestea, unele rapoarte constată o corelație a expresiei MAGEA4 cu parametrii clinici. În carcinomul cu celule scuamoase de cap și gât, expresia MAGEA4 a fost corelată cu supraviețuirea globală slabă și a fost un indicator de prognostic independent al rezultatului slab (Cuffel și colab., 2011). S-a găsit o corelație inversă între expresia MAGEA4 și supraviețuirea pacientului în cancerul NSCLC în stadiu avansat (Yoshida și colab., 2006; Shigematsu și colab., 2010) și cancerul ovarian (Yakirevich și colab., 2003). În cancerul vezicii urinare, expresia MAGEA4 a fost corelată cu recurența și progresia către cancerul invaziv muscular (Bergeron și colab., 2009), iar colorarea puternică a MAGEA4 a fost asociată cu scăderea supraviețuirii (Kocher și colab., 2002). În tumorile stomale gastrointestinale, expresia MAGEA4 împreună cu alți antigeni testiculari cancerosi a fost corelată cu recurența (Perez și colab., 2008), iar, de asemenea, în cancerul vulvar, MAGEA4 a fost detectat mai frecvent în tumorile recurente (Bellati și colab., 2007).

În studiul Cancer Genome Atlas (TCGA) al cancerelor ovariene seroase de grad înalt, expresia MAGEA8 sub mediana a fost asociată cu o creștere a PFS cu 11,4 luni, acesta a fost cel mai puternic efect verificabil. Expresia ridicată a MAGEA8 a fost asociată cu PFS mai slabă la pacienții cu tumori CD3 ridicate, indicând potențial un rol imunosupresor al MAGEA8, cum ar fi prin activarea Tregs imunosupresoare (Eng și colab., 2015).

Grupul cu risc ridicat și grupul cu risc scăzut de pacienți cu cancer de colon au fost distinși prin opt biomarkeri (ZBTB32, OR51B4, CCL8, TMEFF2, SALL3, GPSM1, MAGEA8 și SALL1) care au furnizat referință pentru tratamentul individual (Zhang și colab., 2015).

În experimentele cu linia celulară de carcinoame cu celule scuamoase umane MAGEA5 și -A8 au fost raportate ca predictori negativi ai terapiei anti-EGFR utilizând panitumumab (Hartmann și colab., 2014).

Dovezile pentru asocierea exprimării MAGEA4 cu stadiile tumorale avansate sunt furnizate de unele rapoarte care acoperă diferite tipuri de cancer: în melanomul malign, expresia MAGEA4 a crescut odată cu evoluția bolii de la 9% în tumorile primare la 44% în metastazele la distanță (Barrow și colab., 2006). De asemenea, în cancerul vulvar, expresia MAGEA4 a fost mai frecventă în tumorile cu metastaze ganglionare (Bellati și colab., 2007). Mai mult, expresia MAGEA4 a fost asociată cu tumori de grad înalt sau stadiu avansat în carcinomul endometrial (Chitale și colab., 2005), carcinoamul de col uterin cu celule scuamoase (Sarcevic și colab., 2003) și cancerul vezicii urinare (Bergeron și colab., 2009); Kocher și colab., 2002).

Așa cum este utilizat aici, termenul "secvență de nucleotide" se referă la un heteropolimer de dezoxiribonucleotide.

Secvența de nucleotide care codifică o anumită peptidă, oligopeptidă sau polipeptidă poate fi prezentă în mod natural sau poate fi construită sintetic. În general, segmentele de ADN care codifică peptidele, polipeptidele și proteinele sunt asamblate din fragmente de ADNc și linkeri scurți de oligonucleotide sau dintr-o serie de oligonucleotide, pentru a furniza o genă sintetică care este capabilă să fie exprimată într-o unitate transcripțională recombinantă cuprinzând elemente de reglare derivate dintr-un operon microbial sau viral.

Așa cum este utilizat aici, termenul „o nucleotidă care codifică (sau codifică) o peptidă” se referă la o secvență de nucleotide care codifică peptidă, incluzând codoni artificiali (fabricați de om) de pornire și oprire compatibili cu sistemul biologic, secvența trebuie să fie exprimat de, de exemplu, o celulă dendritică sau un alt sistem celular util pentru producerea de TCR.

Așa cum este utilizat aici, termenul „o nucleotidă care codifică o proteină TCR” se referă la o secvență de nucleotide care codifică proteina TCR, incluzând codoni artificiali (produși de om) de pornire și oprire compatibili cu sistemul biologic, secvența este pentru a fi exprimată, de exemplu, prin celule T sau alt sistem celular util pentru producerea de TCR.

Așa cum se utilizează aici, referirea la o secvență de acid nucleic include atât acidul nucleic monocatenar, cât și acidul nucleic dublu catenar. 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, duplexul unei astfel de secvențe cu complementul său (ADN dublu catenar) și complementul unei astfel de secvențe.

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

5 Regiunea de codificare poate fi derivată dintr-o genă fără mutație („normală”), mutată sau alterată, sau chiar poate fi derivată dintr-o secvență de ADN, sau genă, sintetizată în întregime în laborator utilizând metode bine cunoscute specialiștilor în domeniul sintezei ADN-ului.

Termenul "produs de expresie" înseamnă 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 astfel codifică același/aceeași aminoacid/aminoacizi.

10 Termenul „fragment”, când se referă la o secvență de codificare, înseamnă o porțiune de ADN care cuprinde mai puțin decât regiunea de codificare completă, al cărei produs de expresie păstrează în esență aceeași funcție sau activitate biologică ca produsul de expresie al regiunii de codificare complete.

Termenul „segment de ADN” se referă la un polimer ADN, sub forma unui fragment separat sau ca o componentă a unui construct ADN mai mare, care a fost derivat din ADN-ul izolat cel puțin o dată în formă substanțial pură, *adică* lipsită de contaminare cu materiale endogene și într-o cantitate sau concentrație care să permită identificarea, manipularea și recuperarea segmentului și a secvențelor sale de nucleotide componente prin metode biochimice standard, de exemplu, prin utilizarea unui vector de clonare. Astfel de segmente sunt furnizate sub forma unui cadru de citire deschis neîntrerupt de secvențe interne netranslate, sau introni, care sunt prezenți în mod tipic în genele eucariote.

20 Secvențele de ADN netranslatat pot fi prezente în aval de cadrul de citire deschis, unde acestea nu interferează cu manipularea sau exprimarea regiunilor de codificare.

Termenul "primer" înseamnă o secvență scurtă de acid nucleic care poate fi împerecheată cu o catenă de ADN și oferă un capăt liber 3'-OH la care o ADN polimerază începe sinteza unui lanț dezoxiribonucleotidic.

25 Termenul "promotor" înseamnă o regiune a ADN-ului implicată în legarea ARN polimerazei pentru inițierea transcripției.

Termenul „izolat” înseamnă că materialul este îndepărtat din mediul său original (de exemplu, mediul natural, dacă este natural). De exemplu, o polinucleotidă sau polipeptidă naturală prezentă într-un animal viu nu este izolată, dar aceeași polinucleotidă sau polipeptidă, separată de unele sau de toate materialele coexistente în sistemul natural, este izolată. Într-un aspect, astfel de polinucleotide sunt parte dintr-un vector și/sau astfel de polinucleotide sau polipeptide sunt parte a unei compoziții și încă sunt izolate astfel încât un astfel de vector sau compoziție nu face parte din mediul său natural.

Polinucleotidele și polipeptidele recombinante sau imunogene, descrise aici pot fi, de asemenea, sub formă „purificată”. Termenul „purificat” nu necesită puritate absolută; mai degrabă, este înțeles ca o definiție relativă și poate include preparate care sunt înalt purificate sau preparate care sunt doar parțial purificate, așa cum acești termeni sunt înțeleși de către persoanele de specialitate în domeniu. De exemplu, clonele individuale izolate dintr-o bibliotecă de ADNc au fost purificate în mod convențional până la omogenitate electroforetică. Purificarea materiei prime sau a materialului natural la cel puțin un ordin de mărime, sau două sau trei ordine, sau chiar patru sau cinci ordine de mărime este dezvăluită aici. În plus, o polipeptidă care are o puritate de preferință 99,999%, sau cel puțin 99,99% sau 99,9%; și chiar de dorit 99% în greutate sau mai mult este cuprinsă în mod expres.

Acizii nucleici și produsele de exprimare a polipeptidelor dezvăluite conform prezentei descrieri, precum și vectorii de expresie care conțin astfel de acizi nucleici și/sau astfel de polipeptide, pot fi în „formă îmbogățită”. Așa cum se utilizează aici, termenul „îmbogățit” înseamnă că concentrația materialului este de cel puțin aproximativ 2, 5, 10, 100 sau 1000 de ori concentrația sa naturală (de exemplu), în mod avantajos 0,01%, în greutate, de preferință cel puțin aproximativ 0,1% în greutate. Sunt de asemenea avute în vedere preparate îmbogățite de aproximativ 0,5%, 1%, 5%, 10% și 20% în greutate. Secvențele, structurile, vectorii, clonele și alte materiale cuprinse în prezenta descriere pot fi în mod avantajos în formă îmbogățită sau izolată. Termenul „fragment activ” înseamnă un fragment, de obicei, dintr-o secvență de peptidă, polipeptidă sau acid nucleic, care generează un răspuns imun (*adică*, are activitate imunogenă) atunci când este administrat, singur sau opțional cu un adjuvant adecvat sau într-un vector, la un animal, cum ar fi un mamifer, de exemplu, un iepure sau un șoarece, și incluzând, de asemenea, un om, un astfel de răspuns imun luând forma stimulării unui răspuns al celulelor T în cadrul animalului primitor, cum ar fi un om. Alternativ, "fragmentul activ" poate fi utilizat, de asemenea, pentru a induce un răspuns al celulelor T *in vitro*.

Așa cum sunt utilizați aici, termenii „porțiune”, „segment” și „fragment”, atunci când sunt utilizați în relație cu polipeptide, se referă la o secvență continuă de resturi, cum ar fi resturile de aminoacizi, secvența care formează un subset al unei secvențe mai mari. De exemplu, dacă o polipeptidă a fost supusă tratamentului cu oricare dintre endopeptidazele comune, cum ar fi tripsina sau

chimotripsina, oligopeptidele rezultate dintr-un astfel de tratament ar reprezenta porțiuni, segmente sau fragmente ale polipeptidei inițiale. Când sunt utilizați în relație cu polinucleotidele, acești termeni se referă la produșii produși prin tratarea respectivelor polinucleotide cu oricare dintre endonucleaze.

Așa cum se utilizează aici, termenul „identitate procentuală” sau „identic procentual”, atunci când se referă la o secvență, înseamnă că o secvență este comparată cu o secvență revendicată sau descrisă după alinierea secvenței care trebuie comparată („Secvența comparată”) cu secvența descrisă sau revendicată („Secvența de referință”). Identitatea procentuală este apoi determinată conform următoarelor formule: identitate procentuală = $100 [1 - (C/R)]$

în care, C este numărul de diferențe dintre secvența de referință și secvența comparată pe

lungimea alinierii dintre secvența de referință și secvența comparată, în care

(i) fiecare bază sau aminoacid din secvența de referință care nu are o bază sau aminoacid aliniat corespunzător în secvența comparată și

(ii) fiecare decalaj din secvența de referință și

(iii) fiecare bază sau aminoacid aliniat din secvența de referință care este diferit de o bază sau aminoacid aliniat din secvența comparată, constituie o diferență și

(iv) alinierea trebuie să înceapă de la poziția 1 a secvențelor aliniate;

și R este numărul de baze sau aminoacizi din secvența de referință pe toată lungimea alinierii cu secvența comparată, orice gol creat în secvența de referință fiind, de asemenea, numărat 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 cu sau mai mare decât o identitate procentuală minimă specificată, atunci secvența comparată are identitatea procentuală minimă specificată față de secvența de referință chiar și deși pot exista aliniamente în care identitatea procentuală calculată mai sus aici este mai mică decât identitatea procentuală specificată.

Așa cum s-a menționat mai sus, prezenta descriere oferă astfel o peptidă constând dintr-o secvență de aminoacizi a SECV ID NR:1 pentru utilizare într-o metodă de tratare a cancerului pulmonar fără celule mici și a cancerului pulmonar cu celule mici. Peptidele invenției au capacitatea de a se lega la o moleculă a complexului uman major de histocompatibilitate (MHC) clasa I sau versiuni alungite ale peptidelor menționate la clasa II.

Așa cum se utilizează aici, termenul "omolog" se referă la gradul de identitate (vezi procentul de identitate de mai sus) între secvențele a două secvențe de aminoacizi, *adică* secvențe de peptidă sau polipeptidă. „Omologia” menționată mai sus este determinată prin compararea a două secvențe aliniate în condiții optime peste secvențele care trebuie comparate. O astfel de omologie de secvență poate fi calculată prin crearea unei alinieri utilizând, de exemplu, algoritmul ClustalW. Software-ul de analiză a secvenței disponibile în mod obișnuit, mai precis, Vector NTI, GENETYX sau alte instrumente sunt furnizate de bazele de date publice.

O persoană de specialitate în domeniu va fi capabilă să evalueze dacă celulele T induse de o variantă a unei peptide specifice vor putea reacționa încrucișat cu peptida în sine (Appay și colab., 2006; Colombetti și colab., 2006; Fong și colab., 2001; Zaremba și colab., 1997).

Printr-o „variantă” a secvenței date de aminoacizi se înțelege că lanțurile laterale ale, de exemplu, unuia sau două dintre resturile de aminoacizi sunt modificate (de exemplu, prin înlocuirea lor cu catena laterală a altui rest de aminoacid care apare în mod natural sau altă catenă laterală), astfel încât peptida este încă capabilă să se lege la o moleculă de HLA în mod substanțial în același mod ca o peptidă constând din secvența de aminoacizi dată constând din SECV ID NR:1 până la SECV ID NR:24. De exemplu, o peptidă poate fi modificată astfel încât să mențină, dacă nu să se îmbunătățească, capacitatea de a interacționa cu și de a se lega la canalul de legare al unei molecule de MHC adecvate, cum ar fi HLA-A*02 sau -DR și în acest mod cel puțin menține, dacă nu îmbunătățește, capacitatea de a se lega de TCR-ul celulelor T activate. În mod similar, o proteină TCR poate fi modificată astfel încât să mențină, dacă nu să se îmbunătățească, capacitatea de a interacționa și de a se lega de un complex adecvat de moleculă MHC/KVLEHVVRV (SEQ ID NR:1), cum ar fi HLA-A*02 sau -DR, și în acest fel cel puțin menține, dacă nu îmbunătățește, capacitatea de a activa celulele T.

Aceste celule T pot reacționa încrucișat ulterior cu celulele și pot ucide celulele care exprimă o polipeptidă ce conține secvența naturală de aminoacizi a peptidei înrudite, cum ar fi KVLEHVVRV (SECV ID NR:1), așa cum este definit în aspectele din descriere. După cum poate fi dedus din literatura științifică și bazele de date (Rammensee și colab., 1999; Godkin și colab., 1997), anumite poziții ale peptidelor de legare a HLA sunt de obicei reziduuri ancoră ce formează o secvență de bază care se potrivește cu motivul de legare al receptorului HLA, care este definit de proprietățile polare, electrofizice, hidrofobe și spațiale ale lanțurilor polipeptidice care constituie șanțul de legare. Astfel, o persoană de specialitate în domeniu ar fi capabilă să modifice secvențele de aminoacizi prezentate în SECV ID NR:1 până la SECV ID NR 24, prin menținerea reziduurilor de ancorare cunoscute și ar fi capabilă să determine

dacă astfel de variante mențin capacitatea de a se lega la complexii molecule de MHC din clasa I sau II /KVLEHVVRV (SECV ID NR:1). Variantele dezvăluite aici păstrează capacitatea de a lega complexii molecule de MHC din clasa I sau II/ KVLEHVVRV (SECV ID NR:1). Celulele T care exprimă variantele pot ucide ulterior celulele care exprimă o polipeptidă ce conține secvența naturală de aminoacizi a peptidei înrudite, cum ar fi KVLEHVVRV (SECV ID NR:1).

Peptidele originale (nemodificate) sau proteinele TCR, așa cum sunt descrise aici, pot fi modificate prin substituirea unuia sau mai multor resturi la locuri diferite, posibil selective, din lanțul peptidic, dacă nu se specifică altfel. De preferință, respectivele substituții sunt situate la capătul lanțului de aminoacizi al peptidei menționate. Pentru proteinele TCR, de preferință acele substituții sunt localizate la domenii variabile ale lanțului alfa TCR și lanțului beta TCR. Astfel de substituții pot fi de natură conservatoare, de exemplu, când un aminoacid este înlocuit cu un aminoacid cu structură și caracteristici similare, cum ar fi în cazul în care un aminoacid hidrofob este înlocuit cu un alt aminoacid hidrofob. Și mai conservatoare ar fi înlocuirea aminoacizilor de aceeași dimensiune sau de aceeași natură chimică, cum ar fi în cazul în care leucina este înlocuită cu izoleucină. În studiile asupra variațiilor de secvență în familiile de proteine omoloage care apar în mod natural, anumite substituții de aminoacizi sunt mai des tolerate decât altele, iar acestea prezintă adesea o corelație cu asemănări în dimensiune, sarcină, polaritate și hidrofobicitate între aminoacidul original și înlocuirea acestuia, și aceasta este baza pentru definirea „substituțiilor conservatoare”.

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

Substituțiile mai puțin conservatoare ar putea implica înlocuirea unui aminoacid cu altul care are caracteristici similare, dar este oarecum diferit ca mărime, cum ar fi înlocuirea unei alanine cu un rest de izoleucină. Înlocuirile extrem de neconservatoare ar putea implica înlocuirea unui aminoacid acid cu unul polar sau chiar cu unul care are caracter bazic. Astfel de substituții „radicale” nu pot fi, totuși, respinse ca potențial ineficiente, întrucât efectele chimice nu sunt total previzibile și substituțiile radicale ar putea da naștere la efecte accidentale care nu sunt altfel previzibile din principiile chimice simple.

Desigur, astfel de substituții pot implica alte structuri decât L-aminoacizii comuni. Astfel, D-aminoacizii ar putea fi substituiți cu L-aminoacizii găsiți în mod obișnuit în peptidele antigenice din descriere și totuși să fie încadrați în prezenta dezvăluire.

În plus, aminoacizii non-standard (*adică*, alții decât aminoacizii proteinogeni naturali obișnuiți) pot fi utilizați, de asemenea, în scopuri de substituție pentru a produce imunogeni și polipeptide imunogene conform prezentei descrieri.

Dacă se constată că substituțiile la mai mult de o poziție au ca rezultat o peptidă cu activitate antigenică substanțial echivalentă sau mai mare, așa cum este definită mai jos, atunci combinațiile acestor substituții vor fi testate pentru a determina dacă substituțiile combinate au ca rezultat efecte aditive sau sinergice asupra antigenicității peptidei. Cel mult, nu mai mult de 4 poziții din cadrul peptidei ar fi substituite simultan.

O peptidă constând în principal din secvența de aminoacizi, așa cum este indicată aici, poate avea unul sau doi aminoacizi non-ancoră (vezi mai jos referitor la motivul de ancorare) schimbați fără ca respectiva capacitate de a se lega la o moleculă a complexului major de histocompatibilitate uman (MHC) clasa-I sau -II să fie substanțial modificată sau afectată negativ, în comparație cu peptida nemodificată. Într-un alt caz, într-o peptidă constând în esență din secvența de aminoacizi, așa cum este indicată aici, unul sau doi aminoacizi pot fi schimbați cu partenerii lor conservatori de schimb (vezi aici mai jos) fără ca respectiva capacitate de a se lega la o moleculă a complexului de histocompatibilitate majoră umană (MHC) clasa-I sau -II să fie modificată substanțial, sau afectată negativ, în comparație cu peptida nemodificată.

Resturile de aminoacizi care nu contribuie substanțial la interacțiunile cu TCR pot fi modificate prin înlocuire cu alți aminoacizi a căror încorporare nu afectează substanțial reactivitatea celulelor T și nu elimină legarea la MHC relevant. Astfel, în afară de condiția dată, o peptidă dezvăluită aici poate fi orice peptidă (termenul în care inventatorii includ oligopeptidă sau polipeptidă), care include secvențele de aminoacizi sau o porțiune sau o variantă a acestora așa cum este dată.

Tabelul 9: Variante ale peptidelor invenției

Poziție	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SECV ID NR: 1-13	K	V	L	E	H	V	V	R	V
	Y	L							
	Y	L							L

Variante	Y	L							A
	Y	L							I
	Y	A							
	Y	A							L
	Y	A							A
	Y	A							I
	Y								
	Y								L
	Y								A
	Y								I

Peptidele mai lungi (alungite) pot fi de asemenea adecvate. Este posibil ca epitopii MHC din clasa I, deși de obicei epitopul real sunt resturi care nu afectează în mod substanțial clivajul proteolitic necesar pentru a expune epitopul real în timpul procesării.

- 5 Peptidele descrise pot fi alungite cu până la patru aminoacizi, *adică* 1, 2, 3 sau 4 aminoacizi pot fi adăugați la fiecare capăt în orice combinație între 8 și 11 aminoacizi, se generează din peptida procesată din peptide sau proteine mai lungi care includ epitopul propriu-zis. De exemplu, resturile pot flanca între 4:0 și 0:4. Combinații ale alungirilor conform descrierii pot fi găsite în Tabelul 10.

Tabelul 10: Combinații ale elongațiilor 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

10 Aminoacizii pentru alungire/extensie pot fi peptidele secvenței originale a proteinei sau orice alt aminoacid/aminoacizi. Alungirea poate fi utilizată pentru a spori stabilitatea sau solubilitatea peptidelor.

Astfel, epitopii prezentei invenții sunt identici cu epitopii care apar în mod natural asociați tumorii sau specifici tumorii. În plus, cei dezvăluiți aici diferă de cel mult patru resturi de peptidă de referință, atâta timp cât au activitate antigenică substanțial identică.

15 Alternativ, peptida este alungită pe una sau pe ambele părți cu sau mai mult de 4 aminoacizi, sau până la o lungime totală de până la 30 de aminoacizi. Acest lucru poate duce la peptide de legare a MHC din clasa II. Legarea la MHC din clasa II poate fi testată prin metode cunoscute în domeniu.

20 În consecință, aici sunt dezvăluite peptide și variante ale epitopilor MHC din clasa I, în care peptida sau varianta are o lungime totală între 8 și 100, de preferință între 8 și 30, și cel mai preferat între 8 și 14, și anume 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 aminoacizi, în cazul peptidelor de legare de clasa II alungite lungimea poate fi de asemenea de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 sau 22 de aminoacizi.

25 Desigur, peptida conform prezentei invenții va avea capacitatea de a se lega la o moleculă a complexului major de histocompatibilitate uman (MHC) clasa I. Legarea unei peptide sau a unei variante la un complex MHC poate fi testată prin metode cunoscute în domeniu.

30 Când celulele T specifice pentru o peptidă dezvăluită aici sunt testate împotriva peptidelor substituite, concentrația de peptide la care peptidele substituite ating jumătate din creșterea maximă a lizei în raport cu fondul nu este mai mare de aproximativ 1 mM sau nu mai mult de aproximativ 1 μ M, sau nu mai mult de aproximativ 1 nM, sau nu mai mult de aproximativ 100 pM, sau nu mai mult de aproximativ 10 pM. Într-un alt caz, peptida substituită este recunoscută de celulele T de la mai mult de un individ, cel puțin doi sau chiar trei indivizi.

35 Îmbunătățirea afinității TCR specifici tumorii și exploatarea acestora se bazează pe existența unei ferestre pentru afinități TCR optime. Existența unei astfel de ferestre se bazează pe observațiile conform cărora TCR specifici pentru agenții patogeni restricționați cu HLA-A2 au valori KD care sunt în general de aproximativ 10 ori mai mici în comparație cu TCR specifici pentru autoantigenii asociați tumorilor cu restricție HLA-A2 (Aleksic și colab. 2012; Kunert și colab. 2013). Se cunoaște acum, că deși antigenii

tumoral au potențialul de a fi imunogeni, întrucât tumorile apar din celulele proprii ale individului, numai proteinele mutante sau proteinele cu procesarea translațională modificată vor fi văzute ca străine de către sistemul imunitar. Antigenii care sunt suprareglați sau supraexpresiți (așa-numiții auto-antigeni) nu vor induce neapărat un răspuns imunitar funcțional împotriva tumorii: celulele T care exprimă TCR care sunt foarte reactive la acești antigeni vor fi fost selectate negativ în timus într-un proces cunoscut sub numele de toleranță centrală (Xing și colab. 2012; Ruella și colab. 2014; Sharpe și colab. 2015), ceea ce înseamnă că rămân doar celulele T cu TCR cu afinitate scăzută pentru autoantigeni a invenției. Prin urmare, afinitatea TCR din prezenta invenție față de MAG-003 a fost îmbunătățită prin metode bine cunoscute în domeniu, așa cum este descris mai jos.

O "compoziție farmaceutică" este o compoziție adecvată pentru administrare la o ființă umană într-un cadru medical. De preferință, o compoziție farmaceutică este sterilă și produsă conform ghidurilor GMP.

Compozițiile farmaceutice cuprind peptidele sau proteinele TCR fie sub formă liberă, fie sub formă de sare acceptabilă farmaceutic (vezi, de asemenea, mai sus). Așa cum se utilizează aici, "o sare acceptabilă farmaceutic" se referă la un derivat al peptidelor dezvoltate, în care peptida este modificată prin realizarea de săruri de adiție a acizilor sau bazelor ale agentului. De exemplu, sărurile de adiție a acizilor sunt preparate din baza liberă (de obicei în care forma neutră a medicamentului are o grupare -NH₂ neutră) implicând reacția cu un acid adecvat. Acizii adecvați pentru prepararea sărurilor de adiție a acizilor includ ambii 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, benzoic, acid, acid cinamic, acid mandelic, acid metan sulfonic, acid etan sulfonic, acid p-toluensulfonic, acid salicilic și alții asemenea, precum și acizi anorganici, de exemplu, acid clorhidric, acid bromhidric, acid sulfuric, acid azotic acid fosforic și alții asemenea. În schimb, prepararea sărurilor de adiție a bazelor ale fragmentelor acide care pot fi prezente pe o peptidă sunt preparate utilizând o bază acceptabilă farmaceutic cum ar fi hidroxid de sodiu, hidroxid de potasiu, hidroxid de amoniu, hidroxid de calciu, trimetilamină sau altele asemenea.

Prezenta invenție se referă la o peptidă naturală în care respectiva peptidă constă într-o secvență de aminoacizi conform SECV ID NR: 1 și a fost produsă sintetic (de exemplu sintetizată) ca o sare acceptabilă farmaceutic. Metodele de producere sintetică a peptidelor sunt bine cunoscute în domeniu. Sărurile peptidelor conform prezentei invenții diferă substanțial de peptidele în stările lor *in vivo*, întrucât peptidele generate *in vivo* nu sunt săruri. Forma de sare nenaturală a peptidelor mediază solubilitatea peptidelor, în special în contextul compozițiilor farmaceutice cuprinzând peptide, de exemplu vaccinurile cu peptide așa cum se dezvoltă aici. O solubilitate suficientă și cel puțin substanțială a peptidelor este necesară pentru a furniza în mod eficient peptidele subiectului care trebuie tratat. De preferință, sărurile sunt săruri acceptabile farmaceutic ale peptidelor. Aceste săruri conform invenției includ săruri alcaline și alcalino-pământoase, cum ar fi sărurile seriei Hofmeister cuprinzând ca anioni PO₄³⁻, SO₄²⁻, CH₃COO⁻, Cl⁻, Br⁻, NO₃⁻, ClO₄⁻, I⁻, SCN⁻ și drept cationi NH₄⁺, Rb⁺, K⁺, Na⁺, Cs⁺, Li⁺, Zn²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺ și Ba²⁺. Sărurile particulare sunt selectate dintre (NH₄)₃PO₄, (NH₄)₂HPO₄, (NH₄)H₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, NH₄CH₃COO, NH₄Cl, NH₄Br, NH₄NO₃, NH₄ClO₄, NH₄I, NH₄SCN, Rb₃PO₄, Rb₂HPO₄, RbH₂PO₄, Rb₂SO₄, Rb₄CH₃COO, Rb₄Cl, Rb₄Br, Rb₄NO₃, Rb₄ClO₄, Rb₄I, Rb₄SCN, K₃PO₄, K₂HPO₄, KH₂PO₄, K₂SO₄, KCH₃COO, KCl, KBr, KNO₃, KClO₄, KI, KSCN, Na₃PO₄, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, Na₂SO₄, NaCH₃COO, NaCl, NaBr, NaNO₃, NaClO₄, NaI, NaSCN, ZnCl₂ Cs₃PO₄, Cs₂HPO₄, CsH₂PO₄, Cs₂SO₄, CsCH₃COO, CsCl, CsBr, CsNO₃, CsClO₄, CsI, CsSCN, Li₃PO₄, Li₂HPO₄, LiH₂PO₄, Li₂SO₄, LiCH₃COO, LiCl, LiBr, LiNO₃, LiClO₄, LiI, LiSCN, Cu₂SO₄, Mg₃(PO₄)₂, Mg₂HPO₄, Mg(H₂PO₄)₂, Mg₂SO₄, Mg(CH₃COO)₂, MgCl₂, MgBr₂, Mg(NO₃)₂, Mg(ClO₄)₂, MgI₂, Mg(SCN)₂, MnCl₂, Ca₃(PO₄)₂, Ca₂HPO₄, Ca(H₂PO₄)₂, CaSO₄, Ca(CH₃COO)₂, CaCl₂, CaBr₂, Ca(NO₃)₂, Ca(ClO₄)₂, CaI₂, Ca(SCN)₂, Ba₃(PO₄)₂, Ba₂HPO₄, Ba(H₂PO₄)₂, BaSO₄, Ba(CH₃COO)₂, BaCl₂, BaBr₂, Ba(NO₃)₂, Ba(ClO₄)₂, BaI₂, și Ba(SCN)₂. Sunt preferate în mod special sărurile NH acetat, MgCl₂, KH₂PO₄, Na₂SO₄, KCl, NaCl, și CaCl₂, cum ar fi, de exemplu, clorura sau acetatul (trifluoroacetat).

Într-o variantă de realizare preferată în mod special, compozițiile farmaceutice cuprind peptidele sau proteinele TCR sub formă de săruri ale acidului acetic (acetați), trifluoroacetaților sau acidului clorhidric (cloruri).

Un alt aspect al descrierii furnizează un acid nucleic (de exemplu, o polinucleotidă) care codifică o peptidă și o proteină TCR și variante TCR ale descrierii. Polinucleotida poate fi, de exemplu, ADN, ADNc, ANP, ARN sau combinații ale acestora, fie monocatenar și/sau dublu catenar, fie forme native sau stabilizate de polinucleotide, cum ar fi, de exemplu, polinucleotidele cu un schelet fosforotioat și acesta poate, sau nu, să conțină introni atâta timp cât codifică peptida. Desigur, numai peptidele care conțin resturi de aminoacizi care apar în mod natural unite prin legături peptidice care apar în mod natural sunt

codificabile de către o polinucleotidă. Un alt aspect al descrierii furnizează un vector de expresie capabil să exprime o polipeptidă conform descrierii.

Au fost dezvoltate o varietate de metode pentru a lega polinucleotidele, în special ADN-ul, la vectori, de exemplu, prin intermediul terminalelor coezive complementare. De exemplu, tracturi de homopolimer complementare pot fi adăugate la segmentul de ADN pentru a fi inserat în ADN-ul vector. Vectorul și segmentul de ADN sunt apoi uniți prin legături de hidrogen între cozile homopolimerice complementare pentru a forma molecule de ADN recombinant.

Linkerii sintetici care conțin unul sau mai multe situsuri de restricție oferă o metodă alternativă de unire a segmentului ADN la vectori. Linkerii sintetici care conțin o varietate de situsuri de endonuclează de restricție sunt disponibili comercial dintr-un număr de surse incluzând International Biotechnologies Inc. New Haven, CN, SUA.

O metodă de dorit de modificare a ADN-ului care codifică polipeptida descrisă utilizează reacția în lanț a polimerazei, așa cum este dezvăluită de Saiki RK și colab. (Saiki și colab., 1988). Această metodă poate fi utilizată pentru introducerea ADN-ului 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. Dacă sunt utilizați vectori virali, sunt preferați vectorii variolă sau adenovirusul.

ADN-ul (sau, în cazul vectorilor retrovirali, ARN) poate fi apoi exprimat într-o gazdă adecvată pentru a produce o polipeptidă care cuprinde peptida sau varianta descrierii. Astfel, ADN-ul care codifică peptida sau varianta descrierii poate fi utilizat în conformitate cu tehnici cunoscute, modificate în mod corespunzător având în vedere învățăturile conținute aici, pentru a construi un vector de expresie, care este utilizat apoi pentru a transforma o celulă gazdă adecvată pentru expresie și producerea polipeptidei descrise. Asemenea tehnici le includ pe cele dezvăluite, 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) care codifică polipeptida care constituie compusul descris poate fi asociat la o mare varietate de alte secvențe ADN pentru introducere într-o gazdă adecvată. ADN-ul însoțitor va depinde de natura gazdei, de modul de introducere a ADN-ului în gazdă și dacă se dorește menținerea sau integrarea epizomală.

În general, ADN-ul este inserat într-un vector de expresie, cum ar fi o plasmidă, într-o orientare adecvată și un cadru de citire corect pentru exprimare. Dacă este necesar, ADN-ul poate fi legat de secvențele de nucleotide de control reglator transcripțional și translațional, recunoscute de gazda dorită, deși astfel de controale sunt în general disponibile în vectorul de expresie. Vectorul este apoi introdus în gazdă prin tehnici standard. În general, nu toate gazdele vor fi transformate de vector. Prin urmare, va fi necesar să se selecteze celulele gazdă transformate. O tehnică de selecție implică încorporarea în vectorul de expresie a unei secvențe ADN, cu orice elemente de control necesare, care codifică o trăsătură selectabilă în celula transformată, cum ar fi rezistența la antibiotice.

Alternativ, gena pentru o astfel de trăsătură selectabilă poate fi pe 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 un timp suficient și în condiții adecvate cunoscute de persoanele de specialitate în domeniu, având în vedere învățăturile dezvăluite aici pentru a permite exprimarea polipeptidei, care poate fi apoi recuperat.

Sunt cunoscute multe sisteme de expresie, inclusiv bacterii (de exemplu, *E. coli* și *Bacillus subtilis*), drojdii (de exemplu, *Saccharomyces cerevisiae*), ciuperci filamentoase (de exemplu, *Aspergillus spec.*), celule T vegetale, celule animale și celule T insecte. De preferință, sistemul poate fi de celule de mamifere, cum ar fi celulele CHO disponibile de la ATCC Cell Biology Collection.

O plasmidă tipică de vector de celule de mamifer pentru expresia constitutivă cuprinde promotorul CMV sau SV40 cu o coadă poli A adecvată și un marker de rezistență, cum ar fi neomicina. Un exemplu este pSVL disponibil de la Pharmacia, Piscataway, NJ, SUA. Un exemplu de vector de expresie de mamifer inductibil este pMSG, disponibil de asemenea de la Pharmacia. Vectorii plasmidici de drojdie utili sunt pRS403-406 și pRS413-416 și sunt în general disponibili de la Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, SUA. Plasmidele pRS403, pRS404, pRS405 și pRS406 sunt plasmide integratoare de drojdie (Ylps) și încorporează markerii selectabili de drojdie HIS3, TRP1, LEU2 și URA3. Plasmidele pRS413-416 sunt plasmide centromer de drojdie (Ycps). Vectorii pe bază de promotor CMV (de exemplu, de la Sigma-Aldrich) asigură expresia tranzitorie sau stabilă, expresia sau secreția citoplasmatică și marcarea N-terminală sau C-terminală în diferite combinații de FLAG, 3xFLAG, c-myc sau MAT. Aceste proteine de fuziune permit detectarea, purificarea și analiza proteinei recombinante. Fuziunile cu două coduri oferă flexibilitate în detectare.

Regiunea de reglare a promotorului puternic al citomegalovirusului uman (CMV) conduce la niveluri de expresie a proteinelor constitutive de până la 1 mg/L în celulele COS. Pentru liniile celulare mai puțin puternice, nivelurile de proteine sunt de obicei -0,1 mg/L. Prezența originii de replicare SV40 va avea ca rezultat niveluri ridicate de replicare a ADN-ului în celulele COS permissive la replicare SV40. Vectorii CMV, de exemplu, pot conține originea pMB1 (derivat al pBR322) pentru replicare în celulele bacteriene, gena b-lactamazei pentru selecția rezistenței la ampicilină în bacterii, hGH poliA și originea fl. Vectorii care conțin secvența lider pre-pro-tripsină (PPT) pot direcționa secreția de proteine de fuziune FLAG în mediul de cultură pentru purificare utilizând anticorpi ANTI-FLAG, rășini și plăci. Alți vectori și sisteme de expresie sunt bine cunoscuți în domeniu pentru utilizare cu o varietate de celule gazdă.

Aici sunt dezvoltate două sau mai multe peptide sau variante de peptide ale descrierii care sunt codificate și astfel exprimate într-o ordine succesivă (similar cu constructele „mărgelile pe un șir”). Procedând astfel, peptidele sau variantele de peptide pot fi legate sau fuzionate împreună prin întinderi de aminoacizi linker, cum ar fi de exemplu LLLLLL, sau pot fi legate fără nicio peptidă(e) suplimentară(e) între ele. Aceste constructe pot fi, de asemenea, utilizate pentru terapia cancerului și pot induce răspunsuri imune care implică atât MHC I, cât și MHC II.

Este, de asemenea, dezvoltată aici o celulă gazdă transformată cu un construct de vector polinucleotidic din prezenta descriere. Celula gazdă poate fi fie procariotă, fie eucariotă. Celulele bacteriene preferate pot fi celule gazdă procariote în anumite circumstanțe și, în mod obișnuit, 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 Colecția de culturi de tip american (ATCC) din Rockville, MD, SUA (Nr. ATCC 31343). Celulele gazdă eucariote preferate includ celule de drojdie, insecte și mamifere, de preferință celule de vertebrate, cum ar fi cele de la șoarece, șobolan, maimuță sau linii celulare fibroblastice și de colon umane. Celulele gazdă de drojdie 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 celule de ovar de hamster chinezesc (CHO) disponibile de la ATCC ca CCL61, celule NIH elvețiene de embrioni de șoarece NIH/3T3 disponibile de la ATCC ca CRL 1658, celule COS-1 derivate din rinichi de maimuță disponibile de la ATCC ca CRL 1650 și 293 celule care sunt celule renale embrionare umane. Celulele de insecte preferate sunt celulele Sf9 care pot fi transfectate cu vectori de expresie baculovirus. O prezentare generală privind alegerea celulelor gazdă adecvate pentru exprimare poate fi găsită, de exemplu, în manualul Paulinei Balbas și Argeliei Lorence „Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols”, Partea întâi, ediția a doua, ISBN 978- 1-58829-262-9 și altă literatură cunoscută persoanei de specialitate.

Transformarea gazdelor celulare adecvate cu un construct ADN conform prezentei descrieri este realizată prin metode binecunoscute care depind, de obicei, de tipul de vector utilizat. În ceea ce privește transformarea celulelor gazdă procariote, a se vedea, de exemplu, Cohen și colab. (Cohen și colab., 1972) și (Green și Sambrook, 2012). Transformarea celulelor de drojdie este descrisă de Sherman și colab. (Sherman și colab., 1986). De asemenea, este utilă metoda lui Beggs (Beggs, 1978). În ceea ce privește celulele de vertebrate, reactivi utili în transfectarea unor astfel de celule, de exemplu fosfat de calciu și formulări DEAE-dextran sau lipozomi, sunt disponibili de 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 domeniu pentru transformarea celulelor T de drojdie, celulelor bacteriene, celulelor T de insecte și celulelor de vertebrate.

Celulele transformate cu succes, adică celulele care conțin un construct ADN conform prezentei descrieri, pot fi identificate prin tehnici binecunoscute, cum ar fi PCR. Alternativ, prezența proteinei în supernatant poate fi detectată utilizând anticorpi.

Se va aprecia că anumite celule gazdă din descriere sunt utile în prepararea peptidelor descrise, de exemplu, celulele bacteriene, de drojdie și de insecte T. Cu toate acestea, 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 descrise astfel încât acestea să poată fi încărcate în molecule de MHC adecvate. Astfel, descrierea curentă furnizează o celulă gazdă care cuprinde un acid nucleic sau un vector de expresie conform descrierii.

În unele cazuri, celula gazdă este o celulă prezentatoare de antigen, în special o celulă dendritică sau celulă prezentatoare de antigen. APC încărcate cu o proteină de fuziune recombinantă care conține fosfatază acidă prostatică (PAP) au fost aprobate de U.S. Food and Drug Administration (FDA) pe 29 aprilie 2010, pentru a trata HRPc metastatic asimptomatică sau minim simptomatică (Sipuleucel-T) (Rini și colab., 2006; Small și colab., 2006).

Aici este dezvăluită, de asemenea, o metodă de producere a unei peptide sau a unei variante a acesteia, metoda cuprinzând cultivarea unei celule gazdă și izolarea peptidei din celula gazdă sau din mediul său de cultură.

Într-o altă variantă de realizare, proteinele TCR, acidul nucleic sau vectorul de expresie conform descrierii se utilizează în medicină. De exemplu, peptida poate fi preparată pentru injectare intravenoasă (i.v.), injectare subcutanată (s.c.), injectare intradermică (i.d.), injectare intraperitoneală (i.p.), injectare intramusculară (i.m.). Exemple de metode de injectare cu peptide includ s.c., i.d., i.p., i.m. și i.v. Exemplele de metode de injectare a ADN-ului includ i.d., i.m., s.c., i.p. și i.v. Pot fi administrate doze, de exemplu, între 50 mg și 1,5 mg, de preferință 125 mg până la 500 mg, de peptidă sau ADN și vor depinde de peptida sau ADN-ul respectiv. Dozele din acest interval au fost utilizate cu succes în studiile anterioare (Walter *și colab.*, 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, cADN, ANP, ARN sau o combinație a acestora. Metodele pentru proiectarea și introducerea unui astfel de acid nucleic sunt bine cunoscute în domeniu. O prezentare generală este oferită, de exemplu, de Teufel *și colab.* (Teufel *și colab.*, 2005). Vaccinurile polinucleotidice sunt ușor de preparat, dar modul de acțiune al acestor vectori în inducerea unui răspuns imun nu este pe deplin înțeles. Vectorii adecvați și sistemele de livrare includ ADN viral și/sau ARN, cum ar fi sisteme bazate pe adenovirus, virus vaccinia, retrovirusuri, virus herpes, virus adeno-asociat sau hibrizi care conțin elemente ale mai mult de un virus. Sistemele de livrare nevirale includ lipide cationice și polimeri cationici și sunt bine cunoscute în domeniul eliberării ADN-ului. Livrarea fizică, cum ar fi prin intermediul unui „pistol-genetic” poate fi, de asemenea, utilizată. Peptida sau peptidele codificate de acidul nucleic pot fi o proteină de fuziune, de exemplu, cu un epitop care stimulează celulele T pentru respectivul CDR opus, după cum s-a notat mai sus.

Medicamentul din descriere poate include, de asemenea, unul sau mai mulți adjuvanți. Adjuvanții sunt substanțe care sporesc sau potențează nespecific răspunsul imun (de exemplu, răspunsuri imune mediate de celulele T pozitive pentru CD8 și celulele T helper (TH) la un antigen și, prin urmare, ar fi considerate utile în medicamentul prezentei descrieri. Adjuvanții adecvați includ, însă nu se limitează la, 1018 ISS, săruri de aluminiu, AMPLIVAX®, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, flagelină sau liganzi TLR5 derivați din flagelină, ligand FLT3, GM-CSF IC30, IC31, Imiquimod (ALDARA®), resiquimod, ImuFact IMP321, interleukine cum ar fi IL-2, IL-13, IL-21, Interferon-alfa sau -beta sau derivați pegilați ai acestora, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, ISCOM, JuvImmune®, LipoVac, MALP2, MF59, monofosforil lipidă A, Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, emulsii apă-în-ulei și ulei-în-apă, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, sistem vectorial PepTel®, microparticule pe bază de poli(lactid co-glicolid) [PLG] și dextran, talactoferină SRL172, virozomi și alte particule asemănătoare virusului, YF-17D, VEGF capcană, R848, beta-glucan, Pam3Cys, stimulul QS21 de la Aquila, care este derivat din saponină, extracte micobacteriene și imitații sintetice ale peretelui celular bacterian și alți adjuvanți brevetați, cum ar fi Ribi's Detox, Quil sau Superfos. Sunt preferați adjuvanții precum Freund sau GM-CSF. Mai mulți adjuvanți imunologici (de exemplu, MF59) specifici pentru celulele dendritice și prepararea acestora au fost descriși anterior (Allison și Krummel, 1995). De asemenea, pot fi utilizate citokine. Mai multe citokine au fost direct legate de influențarea migrării celulelor dendritice către țesuturile limfoide (de exemplu, TNF-), accelerând maturarea celulelor dendritice în celule eficiente prezentatoare de antigen pentru limfocitele T (de exemplu, GM-CSF, IL-1 și IL-). 4) (brevetul SUA NR: 5.849.589) și care acționează ca imunoadjuvanți (de exemplu, IL-12, IL-15, IL-23, IL-7, IFN-alfa, IFN-beta) (Gabrilovich *și colab.*, 1996).

S-a raportat, de asemenea, că oligonucleotidele imunostimulatoare CpG sporesc efectele adjuvanților într-un cadru de vaccin. Fără a fi legate de teorie, oligonucleotidele CpG acționează prin activarea sistemului imunitar înăscut (neadaptativ) prin receptorii Toll-like (TLR), în principal TLR9. Activarea TLR9 declanșată de CpG îmbunătățește răspunsurile umorale și celulare specifice antigenului la o mare varietate de antigeni, inclusiv antigeni peptidici sau proteici, viruși vii sau omorâți, vaccinuri cu celule dendritice, vaccinuri celulare autologe și conjugați polizaharidici atât în vaccinurile profilactice, cât și în cele terapeutice. Mai important, îmbunătățește maturarea și diferențierea celulelor dendritice, rezultând o activare îmbunătățită a celulelor TH1 și generarea puternică de limfocite T citotoxice (CTL), chiar și în absența ajutorului celulelor T CD4. Deficiența TH1 indusă de stimularea TLR9 este menținută chiar și în prezența adjuvanților de vaccin, cum ar fi alaunul sau adjuvantul Freund incomplet (IFA), care promovează în mod normal o părtinire TH2. Oligonucleotidele CpG prezintă o activitate adjuvantă și mai mare atunci când sunt formulate sau co-administrate cu alți adjuvanți sau în formulări cum ar fi microparticule, nanoparticule, emulsii lipidice sau formulări similare, care sunt în special necesare pentru inducerea unui răspuns puternic atunci când antigenul este relativ slab. Ele accelerează, de asemenea,

răspunsul imun și permit reducerea dozelor de antigen cu aproximativ două ordine de mărime, cu răspunsuri de anticorpi comparabile la vaccinul cu doză completă fără CpG în unele experimente (Krieg, 2006). US 6.406.705 B1 descrie utilizarea combinată a oligonucleotidelor CpG, a adjuvanților non-nucleici ai acidului și a unui antigen pentru a induce un răspuns imun specific antigenului. Un antagonist CpG TLR9 este dSLIM (imunomodulator dublu Stem Loop) de la Mologen (Berlin, Germania) care este o componentă preferată a compoziției farmaceutice din prezenta descriere. Alte molecule de legare la TLR, cum ar fi TLR 7, TLR 8 și/sau TLR 9 care leagă ARN, pot fi de asemenea utilizate.

Alte exemple de adjuvanți utili includ, dar nu se limitează la acestea, CpG modificate chimic (de exemplu, CpR, Idera), analogi dsARN cum ar fi Poly(I:C) și derivați ai acestora (de exemplu, AmpliGen®, Hiltonol®, poli-(ICLC), poli(IC-R), poli(I:C12U), ADN sau ARN bacterian non-CpG, precum și molecule mici imunoactive și anticorpi precum ciclofosfamidă, sunitinib, Bevacizumab®, celebrex, NCX-4016, sildenafil, tadalafil, vardenafil, sorafenib, temozolomidă, temsirolimus, XL-999, CP-547632, pazopanib, VEGF Trap, ZD2171, AZD2171, anti-CTLA4, alți anticorpi care țintesc structurile cheie ale sistemului imunitar (de exemplu, anti-CD40, anti-TGFbeta, receptor anti-TNFalfa) și SC58175, care pot acționa terapeutic și/sau ca adjuvant. Cantitățile și concentrațiile de adjuvanți și aditivi utili în contextul prezentei descrieri pot fi determinate cu ușurință de către o persoană de specialitate în domeniu, fără experimentare necorespunzătoare.

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

Într-o variantă de realizare preferată a compoziției farmaceutice conform descrierii, adjuvantul este selectat din grupul constând 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 variantă de realizare preferată a compoziției farmaceutice conform descrierii, adjuvantul este selectat din grupul constând din factori de stimulare a coloniilor, cum ar fi factorul de stimulare a coloniilor de macrofage granulocite (GM-CSF, sargramostim), ciclofosfamidă, imiquimod și resiquimod. Într-o variantă de realizare preferată a compoziției farmaceutice conform descrierii, adjuvantul este ciclofosfamidă, imiquimod sau resiquimod. Adjuvanții chiar 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. Pentru aceasta, peptidele și opțional alte molecule sunt dizolvate sau suspendate într-un purtător apos acceptabil farmaceutic. În plus, compoziția poate conține excipienți, cum ar fi tamponi, agenți de legare, agenți de sablare, diluanți, arome, lubrifianți, etc. Peptidele pot fi, de asemenea, administrate împreună cu substanțe de stimulare a imunității, cum ar fi citokinele. O listă extinsă de excipienți care pot fi utilizați într-o astfel de compoziție poate fi, de exemplu, luată 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 de realizat că răspunsul imun declanșat de vaccin conform descrierii atacă cancerul în diferite stadii celulare și 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 câteva ținte, ceea ce poate determina adaptarea cu ușurință a tumorii la atac (scăparea tumorii). În plus, nu toate tumorile individuale exprimă același model de antigeni. Prin urmare, o combinație de mai multe peptide asociate tumorii asigură că fiecare tumoră poartă cel puțin unele dintre ținte. Compoziția este concepută în așa fel încât se așteaptă ca fiecare tumoră să exprime mai mulți dintre antigeni și să acopere mai multe căi independente necesare creșterii și întreținerii tumorii. Astfel, vaccinul poate fi utilizat cu ușurință „de la raft” pentru o populație mai mare de pacienți. Aceasta înseamnă că o preselecție a pacienților care urmează să fie tratați cu vaccin poate fi limitată la tiparea HLA, nu necesită evaluări suplimentare ale biomarkerilor. pentru exprimarea antigenului, dar se asigură totuși că mai multe ținte sunt atacate simultan de răspunsul imun indus, ceea ce este important pentru eficacitate (Banchereau și colab., 2001; Walter și colab., 2012).

Așa cum se utilizează aici, termenul "schelă" se referă la o moleculă care se leagă în mod specific la un determinant (de exemplu, antigenic). Într-o variantă de realizare, o schelă este capabilă să direcționeze entitatea la care este atașat (de exemplu, un (al doilea) fragment de legare a antigenului) către un situs țintă, de exemplu către un tip specific de celulă tumorală sau stromă tumorală care poartă determinantul antigenic (de exemplu, complexul unei peptide cu MHC, conform aplicației în cauză). Într-o altă variantă de realizare, o schelă este capabilă să activeze semnalizarea prin antigenul său țintă, de

exemplu un antigen complex al receptorului de celule T. Schelele includ, dar nu sunt limitate la anticorpi și fragmente ale acestora, domenii de legare la antigen ale unui anticorp, cuprinzând o regiune variabilă a lanțului greu al anticorpului și o regiune variabilă a lanțului ușor al anticorpului, proteine de legare cuprinzând cel puțin un motiv repetat anchirinei și molecule de legare la un antigen cu un singur domeniu (SDAB), aptameri, TCR (solubile) și celule (modificate), cum ar fi celulele T alogene sau autologe. Pentru a evalua dacă o moleculă este o schelă care se leagă de o țintă, pot fi efectuate teste de legare.

Legarea „specifică” înseamnă că schela leagă complexul peptidic-MHC de interes mai bine decât alți complecși peptidici-MHC existenți în mod natural, într-o măsură în care o schelă înarmată cu o moleculă activă care este capabilă să omoare un purtător de celule. Ținta specifică nu este capabilă să omoare o altă celulă fără ținta specifică, dar prezentând alți complecși peptidici-MHC. Legarea la alți complecși peptidici-MHC este irelevantă dacă peptida peptidei reactive încrucișate-MHC nu este naturală, *adică* nu este derivată din HLA-peptidomul uman. Testele pentru a evalua distrugerea celulelor țintă sunt bine cunoscute în domeniu. Acestea trebuie efectuate utilizând celule țintă (celule primare sau linii celulare) cu prezentare peptidă-MHC nealterată sau celule încărcate cu peptide astfel încât să se atingă nivelurile peptidei-MHC care apar în mod natural.

Fiecare schelă poate cuprinde o etichetare care prevede că schela legată poate fi detectată prin determinarea prezenței sau absenței unui semnal furnizat de etichetă. De exemplu, schela poate fi marcată cu un colorant fluorescent sau orice altă moleculă de marker celular aplicabilă. Astfel de molecule marker sunt bine cunoscute în domeniu. De exemplu, o marcarea cu fluorescență, de exemplu furnizată de un colorant fluorescent, poate oferi o vizualizare a aptamerului legat prin microscopie cu scanare cu fluorescență sau laser sau citometrie în flux.

Fiecare schelă poate fi conjugată cu o a doua moleculă activă, cum ar fi, de exemplu, IL-21, anti-CD3 și anti-CD28.

Pentru informații suplimentare despre schele polipeptidice, vezi, de exemplu, secțiunea de bază din WO 2014/071978A1 și referințele citate aici.

Aici sunt dezvăluiți și aptameri. Aptamerii (vezi, de exemplu, WO 2014/191359 și literatura citată aici) sunt molecule scurte de acid nucleic monocatenar, care se pot plia în structuri tridimensionale definite și recunosc structuri țintă specifice. Ei au părut a fi alternative potrivite pentru dezvoltarea de terapii țintite. S-a demonstrat că aptamerii se leagă selectiv la o varietate de ținte complexe cu afinitate și specificitate ridicate.

Aptamerii care recunosc moleculele localizate pe suprafața celulei au fost identificați în ultimul deceniu și oferă mijloace pentru dezvoltarea abordărilor diagnostice și terapeutice. Întrucât s-a demonstrat că aptamerii nu posedă aproape nicio toxicitate și imunogenitate, aceștia sunt candidați promițători pentru aplicații biomedicale. Într-adevăr, aptamerii, de exemplu aptamerii care recunosc antigenul de membrană specifici de prostată, au fost utilizați cu succes pentru terapii țintite și s-au dovedit a fi funcționali în modelele de xenogrefă *in vivo*. Mai mult, au fost identificați aptameri care recunosc linii celulare tumorale specifice.

Aptamerii ADN pot fi selectați pentru a dezvălui proprietăți de recunoaștere cu spectru larg pentru diferite celule canceroase, și în special cele derivate din tumori solide, în timp ce celulele netumorigenice și primare sănătoase nu sunt recunoscute. Dacă aptamerii identificați recunosc nu numai un subtip de tumoră specific, ci mai degrabă interacționează cu o serie de tumori, acest lucru face aptamerii aplicabili ca așa-numite diagnostice și terapii cu spectru larg.

Mai mult, investigarea comportamentului de legare a celulelor cu citometrie în flux a arătat că aptamerii au evidențiat afinități aparente foarte bune care se află în intervalul nanomolar.

Aptamerii sunt utili în scopuri diagnostice și terapeutice. Într-un aspect, cel puțin unul sau mai mulți aptameri sunt absorbiți de celulele tumorale și astfel pot funcționa ca vehicule moleculare pentru livrarea țintită a agenților anti-cancer, cum ar fi siARN în celulele tumorale.

Aptamerii pot fi selectați împotriva țintelor complexe, cum ar fi celulele și țesuturile și complecșii peptidelor în conformitate cu descrierea la îndemână cu molecula MHC, utilizând tehnica Cell-SELEX (Evoluția sistematică a liganzilor prin îmbogățire exponențială).

Peptidele din prezenta descriere pot fi utilizate pentru a genera și dezvolta anticorpi specifici împotriva complecșilor MHC/peptidă. Acestea pot fi utilizate pentru terapie, direcționând toxinele sau substanțele 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 a localizării precise a țesuturilor bolnave.

Prin urmare, aici este dezvăluită, de asemenea, o metodă de producere a unui anticorp recombinant care se leagă în mod specific la un complex uman major de histocompatibilitate (MHC) din clasa I sau II care este complexat cu un antigen restricționat HLA, metoda cuprinzând: imunizarea unui non-combinat modificat genetic, mamifer uman cuprinzând celule care exprimă respectivul complex

uman major de histocompatibilitate (MHC) din clasa I sau II, cu o formă solubilă a unei molecule de MHC din clasa I sau II complexată cu respectivul antigen HLA restricționat; izolarea moleculelor de ARNm din celulele producătoare de anticorpi ale mamiferului non-uman menționat; producerea unei biblioteci de prezentare a fagilor care prezintă molecule de proteine codificate de moleculele de ARNm menționate; și izolarea a cel puțin unui fag din respectiva bibliotecă de prezentare a fagilor, respectiv cel puțin un fag prezentând respectivul anticorp care se leagă în mod specific la numitul complex uman major de histocompatibilitate (MHC) din clasa I sau II fiind complexat cu respectivul antigen restricționat la HLA.

Un alt aspect al invenției este acela de a furniza un anticorp care se leagă în mod specific la un complex uman major de histocompatibilitate (MHC) din clasa I care este complexat cu un antigen restricționat cu HLA, din SECV ID NR:1, în care anticorpul este de preferință un anticorp policlonal, un anticorp monoclonal, un anticorp bispecific și/sau un anticorp himeric.

Metodele respective pentru producerea unor astfel de anticorpi și a complexelor majore de histocompatibilitate din clasa I cu catenă unică, precum și alte instrumente pentru producerea acestor anticorpi sunt descrise în WO 03/068201, WO 2004/084798, WO 01/72768, WO 03/ 070752, și în publicații (Cohen și colab., 2003a; Cohen și colab., 2003b; Denkberg și colab., 2003).

De preferință, anticorpul se leagă cu o afinitate de legare sub 20 nanomolar, de preferință sub 10 nanomolar, la complex, care este de asemenea considerat „specific” în contextul prezentei descrieri.

Prezenta invenție se referă la o proteină TCR sau la o variantă sau fragment funcțional al acesteia care se leagă în mod specific la MAG-003.

Prezenta descriere se referă suplimentar la proteina TCR conform descrierii, în care proteina TCR este modificată (chimic) și/sau include legături non-peptidice.

Prezenta descriere se referă în plus la un acid nucleic, care codifică proteinele TCR conform descrierii, cu condiția ca proteina TCR să nu fie proteina umană completă (completă).

Prezenta descriere se referă în plus la acidul nucleic conform descrierii, *adică* ADN, cADN, ANP, ARN sau combinații ale acestora.

Prezenta descriere se referă în plus la un vector de expresie capabil să exprime un acid nucleic conform prezentei descrieri.

Prezenta invenție se mai referă la o proteină TCR conform prezentei invenții, un acid nucleic conform prezentei descrieri sau un vector de expresie conform prezentei descrieri pentru utilizare în tratamentul cancerului pulmonar fără celule mici.

Aici este dezvăluită o celulă gazdă care cuprinde un acid nucleic conform descrierii sau un vector de expresie conform descrierii.

Mai mult, aici este dezvăluită celula gazdă conform prezentei descrieri, care este o celulă T și, de preferință, o celulă T CD8-pozitivă sau o celulă T CD4-pozitivă.

Prezenta descriere se referă în plus la o metodă de producere a unei proteine TCR conform prezentei descrieri, metoda menționată cuprinzând incubarea PBMC-urilor de la donatori sănătoși HLA-A*02 negativi cu monomeri A2/MAG-003, incubarea PBMC-urilor cu tetramer-ficoeritrină (PE) și izolarea celulelor T cu aviditate ridicată prin sortarea celulelor activate prin fluorescență (FACS)-analiza Calibur.

Dezvăluită aici este, de asemenea, o metodă de producere a unei proteine TCR, metoda menționată cuprinzând incubarea PBMC-urilor de la donatori sănătoși HLA-A*02 negativi cu monomeri A2/p286-1Y2L, incubarea PBMC-urilor cu tetramer-ficoeritrină (PE) și izolarea celulelor T cu aviditate ridicată prin sortarea celulelor activate prin fluorescență (FACS)- analiza Calibur.

Dezvăluită aici este, de asemenea, o metodă de producere a unei proteine TCR, metoda menționată cuprinzând incubarea PBMC-urilor de la donatori sănătoși HLA-A*02 negativi cu monomeri A2/p286-1Y2L9L, incubarea PBMC-urilor cu tetramer-ficoeritrină (PE) și izolarea celulelor T cu aviditate ridicată prin sortarea celulelor activate prin fluorescență (FACS) - analiza Calibur.

Prezenta descriere se referă în plus la o metodă de producere a unei proteine TCR conform prezentei descrieri, metoda menționată cuprinzând obținerea unui șoarece transgenic cu întregul loci al genei TCRαβ umană (1,1 și 0,7 Mb), ale cărui celule T exprimă o varietate variată. repertoriu TCR uman care compensează deficiența TCR de șoarece, imunizarea șoarecelui cu MAG-003, incubarea PBMC obținute de la șoarecii transgenici cu tetramer-ficoeritrină (PE) și izolarea celulelor T cu aviditate ridicată prin sortarea celulelor activate prin fluorescență (FACS) - analiza Calibur.

Aici este dezvăluită, de asemenea, o metodă de producere a unei proteine TCR, metoda menționată cuprinzând obținerea unui șoarece transgenic cu întregul loci al genei TCRαβ umană (1,1 și 0,7 Mb), ale cărui celule T exprimă un repertoriu TCR uman divers care compensează pentru șoarece. Deficiență de TCR, imunizarea șoarecelui cu p286-1Y2L, incubarea PBMC-urilor obținute de la șoarecii

transgenici cu tetramer-ficoeritrină (PE) și izolarea celulelor T cu aviditate ridicată prin analiza de sortare a celulelor activate prin fluorescență (FACS)-Calibur.

Aici este dezvăluită, de asemenea, o metodă de producere a unei proteine TCR, metoda menționată cuprinzând obținerea unui șoarece transgenic cu întregul loci al genei TCR $\alpha\beta$ umană (1,1 și 0,7 Mb), ale cărui celule T exprimă un repertoriu TCR uman divers care compensează pentru șoarece. Deficiență de TCR, imunizarea șoarecelui cu p286-1Y2L9L, incubarea PBMC-urilor obținute de la șoarecii transgenici cu tetramer-ficoeritrină (PE) și izolarea celulelor T cu aviditate ridicată prin analiza de sortare a celulelor activate prin fluorescență (FACS)-Calibur.

Aici este dezvăluită, de asemenea, o metodă de distrugere a celulelor țintă la un pacient, care celulele țintă exprimă în mod aberant MAG-003, metoda cuprinzând administrarea la pacient a unui număr eficient de celule T.

Aici este dezvăluită, de asemenea, utilizarea oricărei proteine TCR descrise, un acid nucleic conform prezentei descrieri, un vector de expresie conform prezentei descrieri, o celulă conform prezentei descrieri sau un limfocit T citotoxic activat conform prezentei descrieri ca medicament sau la fabricarea unui medicament. Este dezvăluită, de asemenea, o utilizare conform prezentei descrieri, în care medicamentul este activ împotriva cancerului. Prezenta invenție se referă la o peptidă, un TCR, un anticorp sau o compoziție farmaceutică conform prezentei invenții, pentru utilizare în tratamentul NSCLC sau SCLC.

Dezvăluită aici este, de asemenea, o utilizare conform descrierii, în care celulele canceroase menționate sunt celule tumorale solide sau hematologice, cum ar fi cancerul cu celule renale, cancerul cerebral, cancerul gastric, cancerul colorectal, cancerul hepatocelular, cancerul pancreatic, cancerul de prostată, leucemia, cancerul de sân, carcinomul cu celule Merkel, melanomul, cancerul ovarian, cancerul de vezică urinară, cancerul uterin, cancerul de vezică biliară și de canal biliar și cancerul esofagian.

Prezenta descriere se referă în plus la proteine marker particulari și biomarkeri bazați pe peptidele conform prezentei descrieri, denumite aici „ținte” care pot fi utilizate în diagnosticul și/sau prognosticul cancerului pulmonar fără celule mici. Prezenta descriere se referă, de asemenea, la utilizarea acestor noi ținte pentru tratamentul cancerului.

Termenul „anticorp” sau „anticorpi” este utilizat aici într-un sens larg și include atât anticorpi policlonali, cât și anticorpi monoclonali. În plus față de moleculele de imunoglobulină intacte sau „complete”, în termenul „anticorpi” sunt incluse și fragmente (de exemplu, fragmente CDR, Fv, Fab și Fc) sau polimeri ai acelor molecule de imunoglobulină și versiuni umanizate ale moleculelor de imunoglobulină, atâta timp cât acestea prezintă oricare dintre proprietățile dorite (de exemplu, legarea specifică a unei (poli)peptide marker de cancer pulmonar fără celule mici, livrarea unei toxine la o celulă de cancer pulmonar fără celule mici care exprimă o genă marker de cancer la un nivel crescut și/ sau inhibarea activității unei polipeptide marker de cancer pulmonar fără celule mici) conform descrierii.

Ori de câte ori este posibil, anticorpii descriși pot fi achiziționați din surse comerciale. Anticorpii descriși pot fi, de asemenea, generați utilizând metode binecunoscute. Specialistul în domeniu va înțelege că fie polipeptide marker de cancer pulmonar fără celule mici de lungime completă, fie fragmente ale acestora pot fi utilizate pentru a genera anticorpii descriși. O polipeptidă care urmează să fie utilizată pentru generarea unui anticorp conform descrierii poate fi parțial sau complet purificată dintr-o sursă naturală sau poate fi produsă utilizând tehnici ADN recombinant.

O persoană de specialitate în domeniu va realiza 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 intenționată (de exemplu, ELISA, imunohistochimie, în imagistica *in vivo*, terapia cu imunotoxine). Anticorpii sunt testați pentru activitatea dorită prin metode cunoscute, în conformitate cu scopul pentru care urmează să fie utilizați anticorpii (de exemplu, ELISA, imunohistochimie, imunoterapie etc.; pentru îndrumări suplimentare privind generarea și testarea anticorpilor, vezi, de exemplu, Greenfield, 2014 (Greenfield, 2014)). De exemplu, anticorpii pot fi testați în teste ELISA sau Western blot, colorare imunohistochimică a cancerelor fixate cu formol sau secțiuni de țesut congelate. După caracterizarea lor inițială *in vitro*, anticorpii destinați utilizării terapeutice sau diagnostice *in vivo* sunt testați conform metodelor de testare clinică cunoscute.

Termenul "anticorp monoclonal" așa cum se utilizează aici se referă la un anticorp obținut dintr-o populație substanțial omogenă de anticorpi, *adică*, anticorpii individuali care cuprind populația sunt identici cu excepția posibilelor mutații care apar în mod natural care pot fi prezente în cantități minore. Anticorpii monoclonali de aici includ în mod specific anticorpi „himerici” în care o porțiune a lanțului greu și/sau ușor este identică sau omoloagă cu secvențele corespunzătoare în anticorpi derivați de la o anumită specie sau aparținând unei anumite clase sau subclase de anticorpi, în timp ce restul al lanțului (lanțurilor) este identică sau omoloagă cu secvențele corespunzătoare în anticorpi derivați de la o altă

specie sau aparținând unei alte clase sau subclase de anticorpi, precum și fragmente ale unor astfel de anticorpi, atâta timp cât ei prezintă activitatea antagonistă dorită (US 4.816.567).

Anticorpii monoclonali conform descrierii pot fi preparați utilizând metode de hibridom. Într-o metodă de hibridom, un șoarece sau alt animal gazdă adecvat este în mod obișnuit imunizat cu un agent de imunizare pentru a produce limfocite care produc sau sunt capabile să producă anticorpi care se vor lega în mod specific la agentul de imunizare. Alternativ, limfocitele pot fi imunizate *in vitro*.

Anticorpii monoclonali pot fi obținuți de asemenea prin metode ADN recombinant, cum ar fi cele descrise în US 4.816.567, ADN-ul care codifică anticorpii monoclonali din descriere poate fi izolat și secvențiat cu ușurință utilizând proceduri convenționale (de exemplu, prin utilizarea sondelor oligonucleotidice care sunt capabile să se lege în mod specific la 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 utilizând 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 papaină a anticorpilor produce în mod obișnuit două fragmente identice de legare la antigen, numite fragmente Fab, fiecare cu un singur situs de legare a antigenului și un fragment Fc rezidual. Tratamentul cu pepsină dă un fragment F(ab')₂ și un fragment pFc'.

Fragmentele de anticorp, indiferent dacă sunt atașate la alte secvențe sau nu, pot include, de asemenea, inserții, deleții, substituții sau alte modificări selectate ale anumitor regiuni sau resturi specifice de aminoacizi, cu condiția ca activitatea fragmentului să nu fie modificată sau afectată semnificativ în comparație la anticorpus nemodificat sau fragmentul de anticorp. Aceste modificări pot asigura unele proprietăți suplimentare, cum ar fi îndepărtarea/adăugarea de aminoacizi capabili de legături disulfurice, creșterea bio-longevității, modificarea caracteristicilor secretoare etc. În orice caz, fragmentul de anticorp trebuie să posede o proprietate bioactivă, cum ar fi activitatea de legare, reglarea legării la domeniul de legare, etc. Regiunile funcționale sau active ale anticorpului pot fi identificate prin mutageniza unei regiuni specifice a proteinei, urmată de exprimarea și testarea polipeptidului exprimat. Astfel de metode sunt ușor evidente pentru o persoană de specialitate în domeniu și pot include mutageniza site-specifică a acidului nucleic care codifică fragmentul de anticorp.

Anticorpii descriși în descriere pot include în continuare anticorpi umanizați sau anticorpi umani. Formele umanizate de anticorpi non-umani (de exemplu, murin) sunt imunoglobulinele himerice, lanțurile de imunoglobuline sau fragmentele acestora (cum ar fi Fv, Fab, Fab' sau alte subsecvenții de anticorpi care leagă antigenul) care conțin secvența minimă derivată din imunoglobulina non-umană. Anticorpii umanizați includ imunoglobuline umane (anticorp receptor) în care resturile dintr-o regiune de determinare complementară (CDR) a primitorului sunt înlocuite cu restri dintr-un CDR al unei specii non-umane (anticorp donator) cum ar fi șoarece, șobolan sau iepure având specificitatea, afinitatea și capacitatea dorite. În unele cazuri, resturile Fv framework (FR) ale imunoglobulinei omului sunt înlocuite cu resturile non-umane corespunzătoare. Anticorpii umanizați pot, de asemenea, restri de cuprindă care nu se găsesc nici în anticorpus primitor, nici în CDR sau secvențele cadru importate. În general, anticorpus umanizat va cuprinde în mod substanțial toate cele puțin unul, și în mod tipic două, domenii variabile, în care toate sau substanțial toate regiunile CDR corespund cu cele ale unei imunoglobuline non-umane și toate sau substanțial toate regiunile FR sunt cele ale unei secvențe consensului imunoglobulinei umane. Anticorpus umanizat în mod optim va cuprinde cel puțin o porțiune dintr-o regiune constantă a imunoglobulinei (Fc), de obicei cea a unei imunoglobuline umane.

Metodele pentru umanizarea anticorpilor non-umani sunt bine cunoscute în domeniu. În general, un anticorp umanizat are unul sau mai multe resturi de aminoacizi introduse în el dintr-o sursă care este non-umană. Aceste resturi de aminoacizi non-umane sunt adesea denumite resturi de „import”, care sunt în mod obișnuit luate dintr-un domeniu variabil „import”. Umanizarea poate fi realizată în esență prin substituirea secvențelor corespunzătoare ale unui anticorp uman cu CDR-uri sau secvențe CDR de rozătoare. În consecință, astfel de anticorpi „umanizați” sunt anticorpi himeri (US 4.816.567), în care substanțial mai puțin decât un domeniu variabil uman intact a fost substituit cu secvența corespunzătoare dintr-o specie non-umană. În practică, anticorpii umanizați sunt în mod tipic anticorpi umani în care unele resturi CDR și posibil unele resturi FR sunt substituite cu resturi din situsuri analoge în anticorpii de rozătoare.

Așa cum este dezvăluit aici, pot fi utilizate animale transgenice (de exemplu, șoareci) care sunt capabile, după imunizare, să producă un repertoriu complet de anticorpi umani în absența producției endogene de imunoglobuline. De exemplu, s-a descris că deleția homozigotă a genei regiunii de unire a lanțului greu al anticorpului la șoarecii himeri și mutații de linie germinală are ca rezultat inhibarea completă a producției de anticorpi endogeni. Transferul matricei de gene a imunoglobulinei germinale

umane la astfel de șoareci mutanți de linie germinativă va avea ca rezultat producerea de anticorpi umani la provocarea antigenului. Anticorpul uman pot fi, de asemenea, produși în biblioteci de afișare a fagilor.

Anticorpul conform invenției sunt de preferință administrați unui subiect într-un purtător acceptabil farmaceutic. De obicei, o cantitate adecvată dintr-o sare acceptabilă farmaceutic este utilizată în formulare pentru a face formularea izotonică. Exemplele de purtător acceptabil din punct de vedere farmaceutic includ soluția salină, soluția Ringer și soluția de dextroză. pH-ul soluției este de preferință de la aproximativ 5 până la aproximativ 8, și mai preferabil de la aproximativ 7 până la aproximativ 7,5. Alți purtători includ preparate cu eliberare susținută, cum ar fi matrici semipermeabile de polimeri solizi hidrofobi care conțin anticorpul, care sunt matrice sub formă de articole modelate, de exemplu, filme, lipozomi sau microparticule. Va fi evident pentru persoanele de specialitate în domeniu că anumiți purtători pot fi mai preferați în funcție, de exemplu, de calea de administrare și concentrația anticorpului care este administrat.

Anticorpul pot fi administrați subiectului, pacientului sau celulei prin injecție (de exemplu, intravenoasă, intraperitoneală, subcutanată, intramusculară) sau prin alte metode, cum ar fi perfuzia, care asigură livrarea acestuia în fluxul sanguin într-o formă eficientă. Anticorpul pot fi, de asemenea, administrați pe căi intratumorale sau peritumorale, pentru a exercita efecte terapeutice locale și sistemice. Se preferă injecția locală sau intravenoasă.

Dozele și programele eficiente de administrare a anticorpilor pot fi determinate empiric, iar efectuarea unor astfel de determinări se află în competența în domeniu. Persoanele de specialitate în domeniu vor înțelege că doza de anticorpi care trebuie administrați va varia în funcție, de exemplu, de subiectul care va primi anticorpul, calea de administrare, tipul particular de anticorp utilizat și alte medicamente care sunt administrate. O doză zilnică tipică de anticorp utilizat singur poate varia de la aproximativ 1 ($\mu\text{g/kg}$ până la 100 mg/kg greutate corporală sau mai mult pe zi, în funcție de factorii menționați mai sus. După administrarea unui anticorp, de preferință pentru tratarea cancerului pulmonar fără celule mici, eficacitatea anticorpului terapeutic poate fi evaluată în diferite moduri bine cunoscute practicianului de specialitate. De exemplu, dimensiunea, numărul și/sau distribuția cancerului la un subiect care primește tratament pot fi monitorizate utilizând o tumoare standard. tehnici de imagistică. Un anticorp administrat terapeutic care oprește creșterea tumorii, conduce la micșorarea tumorii și/sau previne dezvoltarea de noi tumori, în comparație cu evoluția bolii care ar apărea în absența administrării de anticorpi, este un anticorp eficient pentru tratamentul cancerului.

Mai mult, aici este dezvăluită o metodă pentru producerea unui receptor solubil pentru celule T (sTCR) care recunoaște un complex specific peptidă-MHC. Astfel de receptori solubili de celule T pot fi generați din clone specifice de celule T, iar afinitatea lor poate fi crescută prin mutagenză care țintește regiunile care determină complementaritatea. În scopul selecției receptorului celulelor T, poate fi utilizată afișarea fagilor (US 2010/0113300, (Liddy și colab., 2012)). În scopul stabilizării receptorilor celulelor T în timpul expunerii fagilor și în cazul utilizării practice ca medicament, lanțul alfa și beta poate fi legat, de exemplu, prin legături disulfurice nenative, alte legături covalente (receptor pentru celule T cu un singur lanț) sau prin domenii de dimerizare (Boulter și colab., 2003; Card și colab., 2004; Willcox și colab., 1999). Receptorul celulelor T poate fi legat de toxine, medicamente, citokine (vezi, de exemplu, US 2013/0115191) și domenii care recrutează celule efectoare, cum ar fi un domeniu anti-CD3 etc., pentru a executa anumite funcții pe țintă. celule. Într-un alt aspect, este exprimat în celulele T utilizate pentru transferul adoptiv. Vezi, de exemplu, WO 2004/033685A1, WO 2004/074322A1 și WO 2013/057586A1.

În plus, peptidele și/sau TCR-urile sau anticorpul sau alte molecule de legare din prezenta descriere pot fi utilizate pentru a verifica diagnosticul unui patolog al unui cancer pe baza unei probe biopsie.

Anticorpul sau TCR-urile pot fi, de asemenea, utilizați pentru teste de diagnostic *in vivo*. În general, anticorpul este marcat cu o radionucleotidă (cum ar fi ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^3H , ^{32}P sau ^{35}S) astfel încât tumora să poată fi localizată utilizând imunoscintigrafie. Anticorpul sau fragmentele acestora se pot lega la domeniile extracelulare a două sau mai multe ținte ale unei proteine selectate din grupul constând din proteinele menționate mai sus, iar valoarea afinității (K_d) este mai mică de 1310 mM.

Anticorpul pentru uz diagnostic pot fi marcați cu sonde adecvate pentru detectarea prin diferite metode de imagistică. Metodele de detectare a sondelor includ, dar nu sunt limitate la, microscopie fluorescentă, luminoasă, confocală și electronică; imagistica prin rezonanță magnetică și spectroscopie; fluoroscopie, tomografie computerizată și tomografie cu emisii de pozitroni. Sondele adecvate includ, dar nu se limitează la, fluoresceină, rodamină, eozină și alți fluorofori, radioizotopi, aur, gadolinium și alte lantanide, fier paramagnetic, fluor-18 și alți radionuclizi emițători de pozitroni. În plus, sondele pot fi bi-sau multifuncționale și pot fi detectabile prin mai mult de una dintre metodele enumerate. Acești anticorpi pot fi marcați direct sau indirect cu respectivele sonde. Atașarea sondelor la anticorpi include atașarea covalentă a sondei, încorporarea sondei în anticorp și atașarea covalentă a unui compus de chelare pentru

legarea sondei, printre altele bine recunoscute în domeniu. Pentru imunohistochimie, proba de țesut de boală poate fi proaspătă sau congelată sau poate fi încorporată în parafină și fixată cu un conservant cum ar fi formol. Secțiunea fixată sau încorporată conține proba sunt puse în contact cu un anticorp primar marcat și cu un anticorp secundar, în care anticorpul este utilizat pentru a detecta expresia proteinelor *in situ*.

Prezenta invenție va fi descrisă în continuare în următoarele exemple, totuși, fără a se limita la acestea.

Figura 1 prezintă expresia exonului MAG-003 în MAGEA4 (tumor versus sănătos, date RNASeq). Expresia exonului MAGE-003 în MAGEA4 pe țesuturi sănătoase a fost comparată cu cea pe diferite tumori solide (bare roșii). Subtipurile de țesut sănătos sunt grupate ca țesuturi cu risc ridicat (bare verde închis), mediu (bare verde deschis) și țesuturi cu risc scăzut (bare gri). Fiecare bară reprezintă o singură probă. Expresie ridicată pe țesuturile normale a fost găsită doar în placentă și testicul (risc scăzut). (RPKM = citiri pe kilobază per milion de citiri mapate).

Figura 2 prezintă expresia exonului MAG-003 pe MAGEA8 (tumoră versus țesut sănătos, date RNASeq). Expresia exonului MAGEA8 pe țesuturile sănătoase a fost comparată cu cea pe diferite tumori solide (bare roșii). Subtipurile de țesut sănătos sunt grupate ca țesuturi cu risc ridicat (bare verde închis), mediu (bare verde deschis) și țesuturi cu risc scăzut (bare gri). Fiecare bară reprezintă o singură probă. Expresia ridicată pe țesuturile normale a fost găsită doar în placentă (risc scăzut). (RPKM = citiri pe kilobază per milion de citiri mapate).

Figurile 3-5 arată eliberarea de IFN γ din celulele T CD8 $^{+}$ electroporate cu ARN de lanț alfa și beta de TCR-uri specifice MAG-003 după co-incubare cu celule țintă încărcate cu peptidă MAG-003 (SEQ ID NR:1) sau diverse MAG-003 variante de substituție cu alanină la pozițiile 1-9 din SECV ID NR:1 așa cum este dezvăluit aici.

Figura 6 prezintă expresia MAGEA4 conform exemplului 7, ARNm MAGEA4 este detectabil în speciamele de cancer prezentate. Nivelul de expresie acoperă o gamă de expresie considerabilă în cancerul de cap și gât și speciamele de cancer pulmonar non-mic (HNSCC062T1, HNSCC064T1 și NSCLC004T1) până la o expresie destul de scăzută în speciamele de cancer pulmonar non-mic și cancer ovarian (NSCLC006T1 și OC036T1).

Exemple

Setările alo-reactive pot fi utilizate pentru a evita auto-toleranța și pentru a produce celule T cu o aviditate mai mare în comparație cu celulele T derivate din setări autologe, *adică* pacienți. Exemple de astfel de setări includ generarea *in vitro* de celule T reactive allo-HLA, specifice peptidei (Sadovnikova și *colab.* 1998; Savage și *colab.* 2004; Wilde și *colab.* 2012) și imunizarea șoarecilor transgenici pentru MHC uman sau TCR uman (Stanislawski și *colab.* 2001; Li și *colab.* 2010).

Exemplul 1

Generarea *in vitro* de celule T reactive alo-HLA, specifice peptidei (Savage și *colab.* 2004)

PBMC-uri de la donatori sănătoși HLA-A*02 negativi au fost utilizate după obținerea consimțământului informat. Monomerii HLA-A2 de clasa I biotinilați recombinanți și tetramerii fluorescenți A2 care conțin MAG-003 au fost obținuți de la MBLI (Woburn, MA). PBMC-urile au fost incubate cu anti-CD20SA diluat în soluție salină tamponată cu fosfat (PBS) timp de 1 oră la temperatura camerei, spălate și incubate cu monomeri A2/MAG-003 biotinilați timp de 30 de minute la temperatura camerei, spălate și placcate la 3×10^6 celule/ bine în plăci cu 24 de godeuri în RPMI cu 10% ser AB uman. Interleukina 7 (IL-7; R&D Systems, Minneapolis, MN) a fost adăugată în ziua 1 la 10 ng/mL și IL-2 (Chiron, Harefield, Marea Britanie) a fost adăugată la 10 U/mL în ziua 4. Peste o 5 Celulele din perioada săptămânală au fost restimulate săptămânal cu PBMC proaspete, amestecate cu celule de răspuns într-un raport de 1:1 și placcate la 3×10^6 /godeu în plăci cu 24 de godeuri.

Pentru a obține celule T cu aviditate ridicată, se incubează aproximativ 10^6 PBMC-uri cu HLA-A2/MAG-003 tetramer-ficoeritrină (PE) (obținută de la MBLI) timp de 30 de minute la 37°C, urmată de izotiocianat anti-CD8-fluoresceină. (FITC)/allofococianină (APC) timp de 20 de minute la 4°C, urmată de sortarea celulelor activate prin fluorescență (FACS)-analiza Calibur. Sortarea s-a făcut cu un FACS-Vantage (Becton Dickinson, Cowley, Oxford, Regatul Unit). Celulele tetramer pozitive sortate au fost extinse în plăci cu 24 de godeuri utilizând, per godeu, 2×10^5 celule sortate, 2×10^6 PBMC-uri A2-negative iradiate ca alimentatoare, 2×10^4 perle CD3/CD28/mL (Dynal, Oslo Norvegia) și IL-2 (1000) U/ml). Celulele T cu aviditate ridicată, astfel obținute, au fost apoi utilizate pentru a identifica și izola TCR-uri pentru determinarea secvențelor de aminoacizi/ADN și donarea în vectori de expresie utilizând metode bine cunoscute în domeniu.

Exemplul 2

Imunizarea șoarecilor transgenici pentru MHC uman sau TCR uman

MAG-003 a fost utilizat pentru a imuniza șoarecii transgenici cu întregul loci al genei TCR $\alpha\beta$ umană (1,1 și 0,7 Mb), ale căror celule T exprimă un repertoriu divers de TCR uman care compensează deficit de TCR la șoarece. (Li și colab. 2010). Pentru a obține celule T cu aviditate ridicată, se incubează PBMC-urile obținute de la șoarecii transgenici cu tetramer-ficoeritrină (PE), urmată de sortarea celulelor așa cum este descris mai sus. Celulele T cu aviditate ridicată, astfel obținute, au fost apoi utilizate pentru a identifica și izola TCR-uri pentru determinarea secvențelor de aminoacizi/ADN și donarea în vectori de expresie utilizând metode bine cunoscute în domeniu.

Într-un aspect, MAG-003 și variantele sale, adică p286-1Y2L (având 2 substituții de aminoacizi, SECV ID NR:2) și p286-1Y2L9L (având 3 substituții de aminoacizi, SECV ID NR:3) prezintă afinitate puternică de legare și stabilitate față de molecula HLAA* 0201. În particular, p286-1Y2L9L a arătat capacitatea de a induce CTL-uri specifice care, într-un aspect, lizează celulele canceroase țintă atât de la PBMC ale donatorilor sănătoși, cât și de la șoarecii transgenici HLA-A2.1/Kb. Vezi, de exemplu, (Wu și colab. 2011).

Pentru a obține TCR cu aviditate mare pentru complexe MHC I sau II/p286-1Y2L sau p286-1Y2L9L, aceste peptide pot fi utilizate în metodele descrise în exemplele 1 și 2. Celulele T cu aviditate ridicată, astfel obținute, au fost apoi utilizate pentru a identifica și izola TCR-uri pentru determinarea secvențelor de aminoacizi/ADN și donarea în vectori de expresie utilizând metode bine cunoscute în domeniu.

Variantele TCR cu aviditate ridicată pot fi, de asemenea, selectate dintr-o bibliotecă de mutații CDR prin prezentarea de drojdie, fagi sau celule T (holler și colab. 2003; Li și colab. 2005; Chervin și colab. 2008). Variantele TCR candidate, astfel, oferă îndrumări pentru proiectarea mutațiilor CDR-urilor TCR pentru a obține variante de TCR cu aviditate ridicată (Robbins și colab. 2008; Zoete și colab. 2007). Exemplul 3: Clonarea TCR

Metodele de donare a TCR sunt cunoscute în domeniu, de exemplu, așa cum este descris în US 8.519.100. Oligonucleotida A1 specifică secvenței regiunii variabile a lanțului alfa care codifică situsul de restricție NdeI, o metionină introdusă pentru inițierea eficientă a exprimării în bacterii și oligonucleotida A2 specifică a secvenței regiunii constante a lanțului alfa care codifică locul de restricție Sall se utilizează pentru a amplifica lanțul alfa. regiune variabilă. În cazul lanțului beta, o oligonucleotidă specifică secvenței de regiune variabilă a lanțului beta care codifică situsul de restricție, de ex. NdeI, o metionină introdusă pentru inițierea eficientă a expresiei în bacterii și o oligonucleotidă B2 specifică secvenței de regiune constantă a lanțului beta care codifică situsul de restricție, de exemplu AgeI sunt utilizate pentru a amplifica regiunea variabilă a lanțului beta.

Regiunile variabile alfa și beta au fost donate în plasmide de expresie pe bază de pGMT7 care conțin fie Ca, fie Cp prin metode standard descrise în (Molecular Cloning a Laboratory Manual Third edition a Sambrook și Russell). Plasmidele au fost secvențiate utilizând un analizor de DNA Applied Biosystems 373031.

Secvențele de ADN care codifică lanțul alfa TCR tăiat cu NdeI și Sall au fost legate în vectorul pGMT7+Ca, care a fost tăiat cu NdeI și XhoI. Secvențele de ADN care codifică lanțul beta TCR tăiate cu NdeI și AgeI au fost legate într-un vector pGMT7+Cp separat, care a fost de asemenea tăiat cu NdeI și AgeI. Plasmidele ligate sunt transformate în celule XL1-albastre ale tulpinii de *Escherichia coli* competente și plasate pe plăci LB/agar care conțin 100 μg/ml ampicilină. După incubarea peste noapte la 37°C, coloniile individuale sunt culese și crescute în 10 ml LB conținând 100 μg/ml ampicilină peste noapte la 37°C cu agitare. Plasmidele clonate sunt purificate utilizând un kit Miniprep (Qiagen), iar insertul este secvențiat utilizând un secvențietor ADN automat (Lark Technologies).

Exemplul 4: Modificare genetică celulă T autoloagă

Celulele T pot fi proiectate pentru a exprima TCR cu aviditate ridicată (așa-numitele terapii TCR) sau receptori de antigen himeric (CAR) derivați de fuziunea proteinelor care au specificitate antigenului îmbunătățită față de complexul MHC I/MAG-003 sau complexul MHC II/MAG-003. Într-un aspect, această abordare depășește unele dintre limitările asociate toleranței centrale și periferice și generează celule T care vor fi mai eficiente la țintirea tumorilor fără a necesita activarea de novo a celulelor T la pacient.

Pentru a obține celule T care exprimă TCR conform prezentei descrieri, acizii nucleici care codifică lanțurile TCRalfa și/sau TCR-beta specifice tumorii identificate și izolate, așa cum este descris în exemplele 1-3, au fost clonați în vectori de expresie, cum ar fi retrovirusul gamma sau lentivirusul. Virusurile recombinante au fost generați și apoi testați pentru funcționalitate, cum ar fi specificitatea antigenului și aviditatea funcțională. O parte alicotă din produsul final este apoi utilizată pentru a transduce populația de celule T țintă (în general purificată din PBMC ale pacientului), care este extinsă înainte de perfuzia în pacient.

Lanțurile TCR introduse într-o celulă T periferică pot concura cu lanțurile TCR endogene pentru asocierea cu complexul CD3, care este necesar pentru exprimarea la suprafața TCR. Întrucât un nivel ridicat de expresie a suprafeței TCR este esențial pentru a conferi o sensibilitate adecvată pentru declanșarea de către celulele care exprimă antigenul tumoral țintă (Cooper *și colab.*, 2000; Labrecque *și colab.*, 2001), strategiile care îmbunătățesc nivelurile de expresie a genei TCR-alfa și TCR-beta fiind o considerație importantă în terapia genică TCR.

Pentru a crește expresia TCR din prezenta descriere, promotori puternici, cum ar fi repetările terminale lungi retrovirale (LTR), citomegalovirusul (CMV), virusul celulelor stem murine (MSCV) U3, fosfoglicerat kinaza (PGK), β -actina., ubiquitină și un promotor compozit al virusului simian 40 (SV40)/CD43 (Cooper *și colab.*, 2004; Jones *și colab.*, 2009), factorul de alungire (EF)-1a (Tsuji *și colab.*, 2005) și focarul splinei Promotorul virusului formator (SFFV) (Joseph *și colab.*, 2008), poate fi utilizat în prezenta descriere.

Pe lângă promotorii puternici, multe casete de expresie TCR conțin elemente suplimentare care pot îmbunătăți expresia transgenelor, inclusiv un tract central polipurinic (cPPT), care promovează translocarea nucleară a constructelor lentivirale (Follenzi *și colab.*, 2000) și element reglator posttranscripțional al virusului hepatitei marmotei (wPRE), care crește nivelul de exprimare a transgenei prin creșterea stabilității ARN (Zufferey *și colab.*, 1999).

Obținerea exprimării la nivel înalt de suprafață a TCR necesită ca atât lanțurile TCR-alfa, cât și TCR-beta ale TCR introdus să fie transcrise la niveluri înalte. Pentru a face acest lucru, lanțurile TCR-alfa și TCR-beta din prezenta descriere pot fi donate în constructe bi-cistronice într-un singur vector, care s-a dovedit a fi capabil să depășească acest obstacol. Utilizarea unui loc de intrare intraribozomal viral (IRES) între lanțurile TCR-alfa și TCR-beta are ca rezultat expresia coordonată a ambelor lanțuri, întrucât lanțurile TCR-alfa și TCR-beta sunt generate dintr-o singură transcriere care este ruptă în două proteine în timpul translației, asigurându-se că se produce un raport molar egal al lanțurilor TCR-alfa și TCR-beta. (Schmitt *și colab.*, 2009).

O altă modificare care s-a dovedit a fi benefică pentru creșterea expresiei transgenei TCR este optimizarea codonilor. Redundanța în codul genetic permite ca unii aminoacizi să fie codificați de mai mult de un codon, dar anumiți codoni sunt mai puțin „optimi” decât alții din cauza disponibilității relative a ARNt-urilor potrivite, precum și a altor factori (Gustafsson *și colab.*, 2004). Modificarea secvențelor genelor TCR-alfa și TCR-beta astfel încât fiecare aminoacid să fie codificat de codonul optim pentru expresia genei de mamifere, precum și eliminarea motivelor de instabilitate a ARNm sau a situsurilor de îmbinare criptică, s-a dovedit că îmbunătățește semnificativ TCR-alfa și TCR. -expresia genei beta (Scholten *și colab.*, 2006).

Mai mult, împerecherea greșită între lanțurile TCR introduse și cele endogene poate duce la dobândirea de specificități care prezintă un risc semnificativ pentru autoimunitate. De exemplu, formarea de dimeri TCR micști 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 introdus (Kuball *și colab.*, 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, scăzând în același timp capacitatea lanțurilor introduse de a se asocia cu TCR-ul endogen. Aceste strategii pot include înlocuirea domeniilor C-terminale TCR-alfa și TCR-beta umane cu omologii lor murini (domeniul C-terminal murinizat); generarea unei a doua legături disulfurice intercatenare în domeniul C-terminal prin introducerea unui al doilea rest de cisteină în ambele lanțuri TCR-alfa și TCR-beta ale TCR introdus (modificare cisteină); schimbarea restrilor care interacționează în domeniile C-terminale ale lanțului TCR-alfa și TCR-beta ("knob-in-hole"); iar fuzionarea domeniilor variabile ale lanțurilor TCR-alfa și TCR-beta direct la CD3 ζ (fuziune CD3 ζ). (Schmitt *și colab.*, 2009).

Prezenta descriere furnizează proteine TCR care sunt utile în tratarea cancerelor/tumorilor, de preferință cancer pulmonar fără celule mici care prezintă în exces sau exclusiv MAG-003.

Exemplul 5: Modificarea genetică a celulelor T alogene

Celulele T gamma delta ($\gamma\delta$), care sunt efectori de limfocite T neconvenționali implicați în prima linie de apărare împotriva agenților patogeni, pot interacționa cu și eradică celulele tumorale într-o manieră independentă de MHC prin activarea receptorilor, printre alții, lanțurile TCR-gamma și TCR-delta. Aceste celule T $\gamma\delta$ prezintă un fenotip preactivat care permite producția rapidă de citokine (IFN- γ , TNF- α) și un răspuns citotoxic puternic la activare. Aceste celule T au activitate antitumorală împotriva multor tipuri de cancer și sugerează că imunoterapia mediată de celule T $\gamma\delta$ este fezabilă și poate induce răspunsuri tumorale obiective. (Braza *și colab.*, 2013).

Progresele recente utilizând antigeni imobilizate, anticorpi monoclonali agoniști (mAb), celule prezentatoare de antigen artificiale derivate din tumori (aAPC) sau combinații de mAb activatori și aAPC

au avut succes în extinderea celulelor T gamma delta cu repertorii TCR oligoclonale sau policlonale. De exemplu, complexul major de histocompatibilitate imobilizat A legat de lanțul Clasa I a fost un stimul pentru celulele T $\gamma\delta$ care exprimă izotipurile TCR δ 1, iar anticorpii de activare legați de plăci au extins celulele V δ 1 și V δ 2 ex vivo. Au fost produse din punct de vedere clinic cantități suficiente de TCR δ 1, TCR δ 2 și TCR δ 1^{neg}TCR δ 2^{neg} în urma co-cultivării pe aAPC, iar aceste subseturi au prezentat diferențe în fenotipul memoriei și reactivitatea la tumori *in vitro* și *in vivo*. (Deniger și colab. 2014).

În plus, celulele T $\gamma\delta$ sunt susceptibile de modificare genetică, după cum este evidențiat prin introducerea lanțurilor TCR-alfa și TCR-beta. (Hiasa și colab. 2009). Un alt aspect al prezentei descrieri se referă la producerea de celule T $\gamma\delta$ care exprimă TCR-alfa și TCR-beta care se leagă la MAG-003. Pentru a face acest lucru, celulele T $\gamma\delta$ sunt extinse prin metode descrise de Deniger și colab. 2014, urmată de transducerea virusurilor recombinante care exprimă TCR-urile care se leagă la MAG-003 (așa cum este descris în Exemplul 3) în celulele T $\gamma\delta$ expandate. Celulele T $\gamma\delta$ transduse de virus sunt apoi perfuzate în pacient.

Exemplul 6: Imunogenitate și date funcționale ale celulelor T

Imunogenitatea MAG-003 a fost testată folosind protocoale care imită procedura de fabricație pentru un produs farmaceutic. Amorsarea celulelor T specifice MAG-003 a fost observată pentru donatorii sănătoși. Celulele T generate au fost capabile să omoare celulele țintă încărcate cu peptide, demonstrând funcționalitatea lor. Datele au demonstrat că 1) MAG-003 este o țintă imunogenă și 2) care a generat celule T împotriva MAG-003 sunt funcționale.

Datele suplimentare, așa cum au fost generate, au furnizat dovezi că MAG-003 este o peptidă cu legare foarte bună la HLA* 02:01.

Exemplul 7: Expresia MAGEA4 mRNA în țesuturi

Hibridizarea *in situ* (ISH) este utilizată pentru a detecta expresia ARNm direct în secțiuni de țesut fixate cu formol sau congelate. Datorită sensibilității sale ridicate și rezoluției sale spațiale, este o metodă potrivită pentru a determina expresia țintă specifică tipului de celule și distribuția sau frecvența exprimării țintei în secțiunile de țesut canceros.

ISH a fost efectuat pentru a detecta ARNm MAGEA4 utilizând tehnologia BaseScope™ dezvoltată de Advanced Cell Diagnostics (ACD). Tehnologia BaseScope™ se bazează pe hibridizarea la patru perechi de sonde oligonucleotidice în formă de Z la secvența țintă. Amplificarea semnalului este realizată prin amplificarea ADN-ului ramificat, care se bazează pe mai multe etape de hibridizare a oligonucleotidelor, formând în cele din urmă un arbore ADN ramificat (bDNA). În cele din urmă, un număr mare de sonde marcare hibridizează cu ramurile arborelui ADN și semnalul îmbunătățit poate fi detectat. Kitul de detecție cromogenic BaseScope™ (RED) include sonde marcate care sunt legate de o enzimă (fosfatază alcalină). Detectarea semnalului depinde de conversia enzimatică a substratului cromogen FastRed, care amplifică suplimentar semnalul original. BaseScope™ este o tehnologie foarte sensibilă, care se datorează procesului eficient de amplificare a semnalului, asociat cu sensibilitatea ridicată și legarea robustă a perechilor de sonde Z de ARNm țintă, chiar dacă este parțial reticulat sau degradat. Conform ACD, legarea unei singure perechi de sonde la fiecare moleculă de ARNm este suficientă pentru a genera un semnal ISH detectabil.

Fiecare experiment ISH este subdivizat în două procese metodologice: 1) pretratarea țesuturilor pentru regăsirea țintei și 2) hibridizarea țintei, amplificarea semnalului și detectarea. Condițiile optime de pretratare sunt critice pentru detectarea cu succes a țintei în secțiunile de țesut FFPE. Procesul de fixare induce reticularea proteinelor, ADN-ului și ARN-ului în celule și țesuturi și astfel maschează locurile de hibridizare. Astfel, pentru a asigura accesibilitatea ARNm-ului țintă și legarea adecvată a setului de sonde, aceste legături încrucișate trebuie îndepărtate înainte de hibridizarea țintei. Pretratarea țesuturilor include trei etape discrete: 1) Blocarea fosfatazei alcaline endogene prin tratament cu peroxid de hidrogen, 2) recuperarea țintei prin fierbere în reactiv de recuperare țintă și 3) recuperarea țintei prin digestia cu protează. Deoarece gradul de fixare și reticulare poate varia între diferitele blocuri FFPE, condițiile optime de regăsire a țintei trebuie determinate experimental pentru fiecare bloc FFPE individual. Prin urmare, secțiunile de țesut au fost expuse la diferiți timpi de fierbere și digestie cu protează, urmate de hibridizare cu un set de sonde de control pozitiv și negativ. Condițiile optime au fost determinate prin evaluarea microscopică a intensității semnalului specific la controlul pozitiv, a fondului nespecific în controlul negativ și a morfologiei țesuturilor. Pretratarea țesuturilor a fost efectuată conform protocoalelor producătorului. Reactivii de pretratare sunt incluși în kiturile de reactivi BaseScope™. După finalizarea diferitelor etape de pretratare, expresia țintei a fost evaluată prin hibridizarea seturilor de sonde specifice la ARNm de interes cu amplificarea ulterioară a semnalului ADN ramificat și detectarea semnalului cromogen sau fluorescent. Toate testele au fost efectuate conform protocoalelor producătorului.

Tabelul 10: Analiza expresiei

Probă	Țesut	Expresia MAGEA4
HNSCC062T1	Cancer la cap și gât	++
HNSCC064T1	Cancer la cap și gât	++
NSCLC004T1	Cancer pulmonar fără celule mici	++
NSCLC006T1	Cancer pulmonar fără celule mici	+
OC036T1	Cancer ovarian	+
Nivelul general de exprimare al MAGEA4 în secțiunea respectivă: 6 foarte scăzut, + scăzut spre moderat, ++ puternic, +++ foarte puternic		

Lista de referințe

- Adair SJ, Hogan KT (2009). Treatment of ovarian cancer cell lines with 5-aza-2'-deoxycytidine upregulates the expression of cancer-testis antigens and class I major histocompatibility complex-encoded molecules. *Cancer Immunol. Immunother.* 58, 589-601.
- Alves PM, Levy N, Bouzourene H, Viatte S, Bricard G, Ayyoub M, Vuilleumier H, Givel JC, Halkic N, Speiser DE, Romero P, Levy F (2007). Molecular and immunological evaluation of the expression of cancer/testis gene products in human colorectal cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 56, 839-847.
- Andrade VC, Vettore AL, Felix RS, Almeida MS, Carvalho F, Oliveira JS, Chauffaille ML, Andriolo A, Caballero OL, Zago MA, Colleoni GW (2008). Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients. *Cancer Immun.* 8, 2.
- Aubry F, Satie AP, Rioux-Leclercq N, Rajpert-De ME, Spagnoli GC, Chomez P, De BO, Jegou B, Samson M (2001).
- MAGE-A4, a germ cell specific marker, is expressed differentially in testicular tumors. *Cancer* 92, 2778-2785.
- Bar-Haim E, Paz A, Machlenkin A, Hazzan D, Tirosh B, Carmon L, Brenner B, Vadai E, Mor O, Stein A, Lemonnier FA, Tzehoval E, Eisenbach L (2004). MAGE-A8 overexpression in transitional cell carcinoma of the bladder: identification of two tumour-associated antigen peptides. *Br. J Cancer* 91, 398-407.
- Barrow C, Browning J, MacGregor D, Davis ID, Sturrock S, Jungbluth AA, Cebon J (2006). Tumor antigen expression in melanoma varies according to antigen and stage. *Clin Cancer Res* 12, 764-771.
- Bellati F, Napoletano C, Tarquini E, Palaia I, Landi R, Mancini N, Spagnoli G, Rugghetti A, Panici PB, Nuti M (2007).
- Cancer testis antigen expression in primary and recurrent vulvar cancer: association with prognostic factors. *Eur. J Cancer* 43, 2621-2627.
- Bergeron A, Picard V, LaRue H, Harel F, Hovington H, Lacombe L, Fradet Y (2009). High frequency of MAGE-A4 and MAGE-A9 expression in high-risk bladder cancer. *Int. J Cancer* 125, 1365-1371.
- Bhan S, Chuang A, Negi SS, Glazer CA, Califano JA (2012). MAGEA4 induces growth in normal oral keratinocytes by inhibiting growth arrest and apoptosis. *Oncol Rep.* 28, 1498-1502.
- Bode PK, Thielken A, Brandt S, Barghorn A, Lohe B, Knuth A, Moch H (2014). Cancer testis antigen expression in testicular germ cell tumorigenesis. *Mod. Pathol.* 27, 899-905.
- Cabezón T, Gromova I, Gromov P, Serizawa R, Timmermans W, V, Kroman N, Celis JE, Moreira JM (2013).
- Proteomic profiling of triple-negative breast carcinomas in combination with a three-tier orthogonal technology approach identifies Mage-A4 as potential therapeutic target in estrogen receptor negative breast cancer. *Mol. Cell Proteomics.* 12, 381-394.
- Cesson V, Rivals JP, Escher A, Piotet E, Thielemans K, Posevitz V, Dojcinovic D, Monnier P, Speiser D, Bron L, Romero P (2011). MAGE-A3 and MAGE-A4 specific CD4(+) T-cells in head and neck cancer patients: detection of naturally acquired responses and identification of new epitopes. *Cancer Immunol. Immunother.* 60, 23-35.
- Chambost H, Van BN, Brasseur F, Godelaine D, Xerri L, Landi SJ, Theate I, Plumas J, Spagnoli GC, Michel G, Coulie PG, Olive D (2000). Expression of gene MAGE-A4 in Reed-Sternberg cells. *Blood* 95, 3530-3533.
- Chen CH, Huang GT, Lee HS, Yang PM, Yan MD, Chen DS, Sheu JC (1999). High frequency of expression of MAGE genes in human hepatocellular carcinoma. 1999. *Liver* 19, 110-114.
- Chitale DA, Jungbluth AA, Marshall DS, Leitao MM, Hedvat CV, Kolb D, Spagnoli GC, Iversen K, Soslow RA (2005).

Expression of cancer-testis antigens in endometrial carcinomas using a tissue microarray. *Mod. Pathol.* 18, 119-126.

Coral S, Parisi G, Nicolay HJ, Colizzi F, Danielli R, Fratta E, Covre A, Taverna P, Sigalotti L, Maio M (2013).

- 5 Immunomodulatory activity of SGI-110, a 5-aza-2'-deoxycytidine-containing demethylating dinucleotide. *Cancer Immunol. Immunother.* 62, 605-614.

Cruz CR, Gerdemann U, Leen AM, Shafer JA, Ku S, Tzou B, Horton TM, Sheehan A, Copeland A, Younes A, Rooney CM, Heslop HE, Bollard CM (2011). Improving T-cell therapy for relapsed EBV-negative Hodgkin lymphoma by targeting upregulated MAGE-A4. *Clin Cancer Res* 17, 7058-7066.

- 10 Cuffel C, Rivals JP, Zaugg Y, Salvi S, Seelentag W, Speiser DE, Lienard D, Monnier P, Romero P, Bron L, Rimoldi D (2011). Pattern and clinical significance of cancer-testis gene expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J Cancer* 128, 2625-2634.

Daudi S, Eng KH, Mhawech-Fauceglia P, Morrison C, Miliotto A, Beck A, Matsuzaki J, Tsuji T, Groman A, Gnjjatic S, Spagnoli G, Lele S, Odunsi K (2014). Expression and immune responses to MAGE antigens predict survival in epithelial ovarian cancer. *PLoS. ONE.* 9, e104099.

- 15 Duffour MT, Chaux P, Lurquin C, Cornelis G, Boon T, van der Bruggen P (1999). A MAGE-A4 peptide presented by HLA-A2 is recognized by cytolytic T lymphocytes. *Eur. J Immunol.* 29, 3329-3337.

De PE, Arden K, Traversari C, Gaforio JJ, Szikora JP, De SC, Brasseur F, van der Bruggen P, Lethe B, Lurquin C,. (1994). Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics* 40, 360-369.

- 20 Doyle JM, Gao J, Wang J, Yang M, Potts PR (2010). MAGE-RING protein complexes comprise a family of E3 ubiquitin ligases. *Mol Cell* 39, 963-974.

Eng KH, Weir I, Tsuji T, Odunsi K (2015). Immunostimulatory/regulatory gene expression patterns in advanced ovarian cancer. *Genes and Cancer.*

- 25 Forghanifard MM, Gholamin M, Farshchian M, Moaven O, Memar B, Forghani MN, Dadkhah E, Naseh H, Moghbeli M, Raeisossadati R, Abbaszadegan MR (2011). Cancer-testis gene expression profiling in esophageal squamous cell carcinoma: identification of specific tumor marker and potential targets for immunotherapy. *Cancer Biol Ther.* 12, 191-197.

Gerdemann U, Katari U, Christin AS, Cruz CR, Tripic T, Rousseau A, Gottschalk SM, Savoldo B, Vera JF, Heslop HE, Brenner MK, Bollard CM, Rooney CM, Leen AM (2011). Cytotoxic T lymphocytes simultaneously targeting multiple tumor-associated antigens to treat EBV negative lymphoma. *Mol. Ther.* 19, 2258-2268.

- 30 Gunda V, Cogdill AP, Bernasconi MJ, Wargo JA, Parangi S (2013). Potential role of 5-aza-2'-deoxycytidine induced MAGE-A4 expression in immunotherapy for anaplastic thyroid cancer. *Surgery* 154, 1456-1462.

Gure AO, Chua R, Williamson B, Gonen M, Ferrera CA, Gnjjatic S, Ritter G, Simpson AJ, Chen YT, Old LJ, Altorki NK (2005). Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 11, 8055-8062.

- 40 Hartmann S, Meyer TJ, Brands RC, Haubitz IR, Linz C, Seher A, Kubler AC, Muller-Richter UD (2015). MAGE-A expression clusters and antineoplastic treatment in head and neck cancer. *Int. J Mol. Med.* 35, 1675-1682.

Hasegawa H, Mori M, Haraguchi M, Ueo H, Sugimachi K, Akiyoshi T (1998). Expression spectrum of melanoma antigen-encoding gene family members in colorectal carcinoma. *Arch. Pathol. Lab Med.* 122, 551-554.

- 45 Hussein YM, Morad FE, Gameel MA, Emam WA, El Sawy WH, El Tarhouny SA, Bayomy ES, Raafat N (2012).

MAGE-4 gene m-RNA and TGF in blood as potential biochemical markers for HCC in HCV-infected patients. *Med. Oncol* 29, 3055-3062.

- 50 Jacobs JF, Grauer OM, Brasseur F, Hoogerbrugge PM, Wesseling P, Gidding CE, van de Rakt MW, Figdor CG, Coulie PG, de Vries IJ, Adema GJ (2008). Selective cancer-germline gene expression in pediatric brain tumors. *J Neurooncol.* 88, 273-280.

Jia ZC, Ni B, Huang ZM, Tian Y, Tang J, Wang JX, Fu XL, Wu YZ (2010). Identification of two novel HLA-A*0201-restricted CTL epitopes derived from MAGE-A4. *Clin Dev. Immunol.* 2010, 567594.

- 55 Kageyama S, Ikeda H, Miyahara Y, Imai N, Ishihara M, Saito K, Sugino S, Ueda S, Ishikawa T, Kokura S, Naota H, Ohishi K, Shiraishi T, Inoue N, Tanabe M, Kidokoro T, Yoshioka H, Tomura D, Nukaya I, Mineno J, Takesako K, Katayama N, Shiku H (2015). Adoptive Transfer of MAGE-A4 T-cell Receptor Gene-Transduced Lymphocytes in Patients with Recurrent Esophageal Cancer. *Clin. Cancer Res.* Kang J, Lee HJ, Kim J, Lee JJ, Maeng LS (2015). Dysregulation of X chromosome inactivation in high grade ovarian serous adenocarcinoma. *PLoS. ONE.* 10, e0118927.

- Kawagoe H, Yamada A, Matsumoto H, Ito M, Ushijima K, Nishida T, Yakushiji M, Itoh K (2000). Serum MAGE-4 protein in ovarian cancer patients. *Gynecol. Oncol* 76, 336-339.
- Kim K, Cho YM, Park BH, Lee JL, Ro JY, Go H, Shim JW (2015). Histological and immunohistochemical markers for progression prediction in transurethrally resected high-grade non-muscle invasive bladder cancer. *Int. J Clin Exp. Pathol.* 8, 743-750.
- 5 Kobayashi T, Lonchay C, Colau D, Demotte N, Boon T, van der Bruggen P (2003). New MAGE-4 antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on HLA-A1 tumor cells. *Tissue Antigens* 62, 426-432.
- Kocher T, Zheng M, Bolli M, Simon R, Forster T, Schultz-Thater E, Remmel E, Noppen C, Schmid U, Ackermann D, Mihatsch MJ, Gasser T, Heberer M, Sauter G, Spagnoli GC (2002). Prognostic relevance of MAGE-A4 tumor antigen expression in transitional cell carcinoma of the urinary bladder: a tissue microarray study. *Int. J Cancer* 100, 702-705.
- 10 Kubuschok B, Xie X, Jesnowski R, Preuss KD, Romeike BF, Neumann F, Regitz E, Pistorius G, Schilling M, Scheunemann P, Izicki JR, Lohr JM, Pfreundschuh M (2004). Expression of cancer testis antigens in pancreatic carcinoma cell lines, pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis. *Int. J Cancer* 109, 568-575.
- 15 Li J, Yang Y, Fujie T, Tanaka F, Mimori K, Haraguchi M, Ueo H, Mori M, Akiyoshi T (1997). Expression of the MAGE gene family in human gastric carcinoma. *Anticancer Res* 17, 3559-3563.
- Li M, Yuan YH, Han Y, Liu YX, Yan L, Wang Y, Gu J (2005). Expression profile of cancer-testis genes in 121 human colorectal cancer tissue and adjacent normal tissue. *Clin Cancer Res* 11, 1809-1814.
- 20 Lifantseva N, Koltsova A, Krylova T, Yakovleva T, Poljanskaya G, Gordeeva O (2011). Expression patterns of cancer-testis antigens in human embryonic stem cells and their cell derivatives indicate lineage tracks. *Stem Cells Int.* 2011, 795239.
- Luftl M, Schuler G, Jungbluth AA (2004). Melanoma or not? Cancer testis antigens may help. *Br. J Dermatol.* 151, 1213-1218.
- 25 Lin J, Lin L, Thomas DG, Greenson JK, Giordano TJ, Robinson GS, Barve RA, Weishaar FA, Taylor JM, Orringer MB, Beer DG (2004). Melanoma-associated antigens in esophageal adenocarcinoma: identification of novel MAGEA10 splice variants. *Clin Cancer Res* 10, 5708-5716.
- Liu W, Cheng S, Asa SL, Ezzat S (2008). The melanoma-associated antigen A3 mediates fibronectin-controlled cancer progression and metastasis. *Cancer Res* 68, 8104-8112.
- 30 Marcar L, Ihrig B, Hourihan J, Bray SE, Quinlan PR, Jordan LB, Thompson AM, Hupp TR, Meek DW (2015). MAGEA Cancer/Testis Antigens Inhibit MDM2 Ubiquitylation Function and Promote Increased Levels of MDM4. *PLoS. ONE.* 10, e0127713.
- Marcar L, MacLaine NJ, Hupp TR, Meek DW (2010a). Mage-A cancer/testis antigens inhibit p53 function by blocking its interaction with chromatin. *Cancer Res* 70, 10362-10370.
- 35 Marcar L, MacLaine NJ, Hupp TR, Meek DW (2010b). Mage-A cancer/testis antigens inhibit p53 function by blocking its interaction with chromatin. *Cancer Res* 70, 10362-10370.
- Melo DH, Mamede RC, Neder L, Saggioro FP, Figueiredo DL, da Silva WAJ, Jungbluth AA, Zago MA (2011).
- 40 Expression of MAGE-A4 and MAGE-C1 tumor-associated antigen in benign and malignant thyroid diseases. *Head Neck* 33, 1426-1432.
- Mischo A, Kubuschok B, Ertan K, Preuss KD, Romeike B, Regitz E, Schormann C, de BD, Wadle A, Neumann F, Schmidt W, Renner C, Pfreundschuh M (2006). Prospective study on the expression of cancer testis genes and antibody responses in 100 consecutive patients with primary breast cancer. *Int. J Cancer* 118, 696-703.
- 45 Mitchell RT, Camacho-Moll E, MacDonald J, Anderson RA, Kelnar CJ, O'Donnell M, Sharpe RM, Smith LB, Grigor KM, Wallace WH, Stoop H, Wolffenbuttel KP, Donat R, Saunders PT, Looijenga LH (2014). Intratubular germ cell neoplasia of the human testis: heterogeneous protein expression and relation to invasive potential. *Mod. Pathol.* 27, 1255-1266.
- 50 Miyahara Y, Naota H, Wang L, Hiasa A, Goto M, Watanabe M, Kitano S, Okumura S, Takemitsu T, Yuta A, Majima Y, Lemonnier FA, Boon T, Shiku H (2005). Determination of cellularly processed HLA-A2402-restricted novel CTL epitopes derived from two cancer germ line genes, MAGE-A4 and SAGE. *Clin Cancer Res* 11, 5581-5589.
- Montoro JR, Mamede RC, Neder SL, Saggioro FP, Figueiredo DL, Silva WA, Jr., Jungbluth AA, Spagnoli GC, Zago MA (2012). Expression of cancer-testis antigens MAGE-A4 and MAGE-C1 in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 34, 1123-1128.
- 55 Monte M, Simonatto M, Peche LY, Bublik DR, Gobessi S, Pierotti MA, Rodolfo M, Schneider C (2006). MAGE-A tumor antigens target p53 transactivation function through histone deacetylase recruitment and confer resistance to chemotherapeutic agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 11160-11165.

- Nagao T, Higashitsuji H, Nonoguchi K, Sakurai T, Dawson S, Mayer RJ, Itoh K, Fujita J (2003). MAGE-A4 interacts with the liver oncoprotein gankyrin and suppresses its tumorigenic activity. *J Biol Chem* 278, 10668-10674.
- Naota H, Miyahara Y, Okumura S, Kuzushima K, Akatsuka Y, Hiasa A, Kitano S, Takahashi T, Yuta A, Majima Y, Shiku H (2006). Generation of peptide-specific CD8+ T-cells by phytohemagglutinin-stimulated antigen-mRNA transduced CD4+ T-cells. *J Immunol. Methods* 314, 54-66.
- Nishikawa H, Maeda Y, Ishida T, Gnjjatic S, Sato E, Mori F, Sugiyama D, Ito A, Fukumori Y, Utsunomiya A, Inagaki H, Old LJ, Ueda R, Sakaguchi S (2012). Cancer/testis antigens are novel targets of immunotherapy for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 119, 3097-3104.
- Nishimura S, Fujita M, Terata N, Tani T, Kodama M, Itoh K (1997). Expression of MAGE genes in colorectal carcinomas. *Nihon Rinsho Meneki. Gakkai Kaishi* 20, 95-101.
- Oba-Shinjo SM, Caballero OL, Jungbluth AA, Rosemberg S, Old LJ, Simpson AJ, Marie SK (2008). Cancer-testis (CT) antigen expression in medulloblastoma. *Cancer Immun.* 8, 7.
- Ohkuri T, Wakita D, Chamoto K, Togashi Y, Kitamura H, Nishimura T (2009). Identification of novel helper epitopes of MAGE-A4 tumor antigen: useful tool for the propagation of Th1 cells. *Br. J Cancer* 100, 1135-1143.
- Ottaviani S, Colau D, van der Bruggen P, van der Bruggen P (2006). A new MAGE-4 antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on HLA-A24 carcinoma cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 55, 867-872.
- Otte M, Zafrakas M, Riethdorf L, Pichlmeier U, Loning T, Janicke F, Pantel K (2001). MAGE-A gene expression pattern in primary breast cancer. *Cancer Res* 61, 6682-6687.
- Peikert T, Specks U, Farver C, Erzurum SC, Comhair SA (2006). Melanoma antigen A4 is expressed in non-small cell lung cancers and promotes apoptosis. *Cancer Res* 66, 4693-4700.
- Peng JR, Chen HS, Mou DC, Cao J, Cong X, Qin LL, Wei L, Leng XS, Wang Y, Chen WF (2005). Expression of cancer/testis (CT) antigens in Chinese hepatocellular carcinoma and its correlation with clinical parameters. *Cancer Lett.* 219, 223-232.
- Perez D, Herrmann T, Jungbluth AA, Samartzis P, Spagnoli G, Demartines N, Clavien PA, Marino S, Seifert B, Jaeger D (2008). Cancer testis antigen expression in gastrointestinal stromal tumors: new markers for early recurrence. *Int. J Cancer* 123, 1551-1555.
- Prasad ML, Jungbluth AA, Patel SG, Iversen K, Hoshaw-Woodard S, Busam KJ (2004). Expression and significance of cancer testis antigens in primary mucosal melanoma of the head and neck. *Head Neck* 26, 1053-1057.
- Quillien V, Raoul JL, Heresbach D, Collet B, Toujas L, Brasseur F (1997). Expression of MAGE genes in esophageal squamous-cell carcinoma. *Anticancer Res.* 17, 387-391.
- Rammensee HG, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50, 213-219.
- Rammensee HG, Bachmann J, Stevanovic S (1997). *MHC Ligands and Peptide Motifs.* (Heidelberg, Germany: Springer-Verlag).
- Resnick MB, Sabo E, Kondratiev S, Kerner H, Spagnoli GC, Yakirevich E (2002). Cancer-testis antigen expression in uterine malignancies with an emphasis on carcinosarcomas and papillary serous carcinomas. *Int. J Cancer* 101, 190-195.
- Ries J, Schultze-Mosgau S, Neukam F, Diebel E, Wiltfang J (2005). Investigation of the expression of melanoma antigen-encoding genes (MAGE-A1 to -A6) in oral squamous cell carcinomas to determine potential targets for gene-based cancer immunotherapy. *Int. J Oncol.* 26, 817-824.
- Roch N, Kutup A, Vashist Y, Yekebas E, Kalinin V, Izbicki JR (2010). Coexpression of MAGE-A peptides and HLA class I molecules in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 30,1617-1623.
- Saito T, Wada H, Yamasaki M, Miyata H, Nishikawa H, Sato E, Kageyama S, Shiku H, Mori M, Doki Y (2014). High expression of MAGE-A4 and MHC class I antigens in tumor cells and induction of MAGE-A4 immune responses are prognostic markers of CHP-MAGE-A4 cancer vaccine. *Vaccine* 32, 5901-5907.
- Sakurai T, Itoh K, Higashitsuji H, Nagao T, Nonoguchi K, Chiba T, Fujita J (2004). A cleaved form of MAGE-A4 binds to Miz-1 and induces apoptosis in human cells. *J Biol Chem* 279, 15505-15514.
- Sarcevic B, Spagnoli GC, Terracciano L, Schultz-Thater E, Heberer M, Gamulin M, Krajina Z, Oresic T, Separovic R, Juretic A (2003). Expression of cancer/testis tumor associated antigens in cervical squamous cell carcinoma. *Oncology* 64, 443-449.
- Schirmer U, Fiegl H, Pfeifer M, Zeimet AG, Muller-Holzner E, Bode PK, Tischler V, Altevogt P (2013). Epigenetic regulation of L1CAM in endometrial carcinoma: comparison to cancer-testis (CT-X) antigens. *BMC. Cancer* 13, 156.

- Shafer JA, Cruz CR, Leen AM, Ku S, Lu A, Rousseau A, Heslop HE, Rooney CM, Bollard CM, Foster AE (2010). Antigen-specific cytotoxic T lymphocytes can target chemoresistant side-population tumor cells in Hodgkin lymphoma. *Leuk. Lymphoma* 51, 870-880.
- 5 Sharma P, Shen Y, Wen S, Bajorin DF, Reuter VE, Old LJ, Jungbluth AA (2006). Cancer-testis antigens: expression and correlation with survival in human urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res* 12, 5442-5447.
- Shichijo S, Hoshino T, Koufuji K, Hayashi A, Kawamoto M, Kikuchi M, Higuchi T, Ichiki M, Oizumi K, Itoh K (1997). Detection of MAGE-4 protein in sera of lung cancer patients. *Jpn. J Cancer Res* 88, 414-419.
- 10 Shigematsu Y, Hanagiri T, Shiota H, Kuroda K, Baba T, Mizukami M, So T, Ichiki Y, Yasuda M, So T, Takenoyama M, Yasumoto K (2010). Clinical significance of cancer/testis antigens expression in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 68, 105-110.
- Shirakura Y, Mizuno Y, Wang L, Imai N, Amaike C, Sato E, Ito M, Nukaya I, Mineno J, Takesako K, Ikeda H, Shiku H (2012). T-cell receptor gene therapy targeting melanoma-associated antigen-A4 inhibits human tumor growth in non-obese diabetic/SCID/gammacnull mice. *Cancer Sci.* 103, 17-25.
- 15 Simpson AJ, Caballero OL, Jungbluth A, Chen YT, Old LJ (2005). Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev. Cancer* 5, 615-625.
- Soga N, Hori Y, Yamakado K, Ikeda H, Imai N, Kageyama S, Nakase K, Yuta A, Hayashi N, Shiku H, Sugimura Y (2013). Limited expression of cancer-testis antigens in renal cell carcinoma patients. *Mol. Clin Oncol* 1, 326-330.
- 20 Su C, Xu Y, Li X, Ren S, Zhao C, Hou L, Ye Z, Zhou C (2015). Predictive and prognostic effect of CD133 and cancer testis antigens in stage Ib-IIIa non-small cell lung cancer. *Int. J Clin Exp. Pathol.* 8, 5509-5518.
- Takahashi N, Ohkuri T, Homma S, Ohtake J, Wakita D, Togashi Y, Kitamura H, Todo S, Nishimura T (2012). First clinical trial of cancer vaccine therapy with artificially synthesized helper/ killer-hybrid epitope long peptide of MAGEA4 cancer antigen. *Cancer Sci.* 103, 150-153.
- 25 Tahara K, Mori M, Sadanaga N, Sakamoto Y, Kitano S, Makuuchi M (1999b). Expression of the MAGE gene family in human hepatocellular carcinoma 1999. *Cancer* 85, 1234-1240.
- Tanaka F, Mori M, Li J, Fujie T, Mimori K, Haraguchi M, Tanaka Y, Mafune K, Akiyoshi T (1997). High frequency of the expression of the MAGE gene family in human esophageal carcinoma. *Int. J Oncol* 10, 1113-1117.
- 30 Tsuzurahara S, Sata M, Iwamoto O, Shichijo S, Kojiro M, Tanikawa K, Itoh K (1997). Detection of MAGE-4 protein in the sera of patients with hepatitis-C virus-associated hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis. *Jpn. J Cancer Res* 88, 915-918.
- 35 Wang M, Li J, Wang L, Chen X, Zhang Z, Yue D, Ping Y, Shi X, Huang L, Zhang T, Yang L, Zhao Y, Ma X, Li D, Fan Z, Zhao L, Tang Z, Zhai W, Zhang B, Zhang Y (2015). Combined cancer testis antigens enhanced prediction accuracy for prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Int. J Clin Exp. Pathol.* 8, 3513-3528.
- Wilson EM (2010). Androgen receptor molecular biology and potential targets in prostate cancer. *Ther. Adv. Urol.* 2, 105-117.
- 40 Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF (2013). Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 31, 3997-4013.
- 45 Wong PP, Yeoh CC, Ahmad AS, Chelala C, Gillett C, Speirs V, Jones JL, Hurst HC (2014). Identification of MAGEA antigens as causal players in the development of tamoxifen-resistant breast cancer. *Oncogene* 33, 4579-4588.
- Wu ZY, Gao YF, Wu YH, Liu W, Sun M, Zhai MX, Qi YM, Ye Y (2011). Identification of a novel CD8+ T-cell epitope derived from cancer-testis antigen MAGE-4 in oesophageal carcinoma. *Scand. J Immunol.* 74, 561-567.
- 50 Yakirevich E, Sabo E, Lavie O, Mazareb S, Spagnoli GC, Resnick MB (2003). Expression of the MAGE-A4 and NYESO-1 cancer-testis antigens in serous ovarian neoplasms. *Clin Cancer Res* 9, 6453-6460.
- Yang B, O'Herrin SM, Wu J, Reagan-Shaw S, Ma Y, Bhat KM, Gravekamp C, Setaluri V, Peters N, Hoffmann FM, Peng H, Ivanov AV, Simpson AJ, Longley BJ (2007). MAGE-A, mMage-b, and MAGE-C proteins form complexes with KAP1 and suppress p53-dependent apoptosis in MAGE-positive cell lines. *Cancer Res* 67, 9954-9962.
- 55

- Yamada R, Takahashi A, Torigoe T, Morita R, Tamura Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Kubo T, Watarai K, Kondo T, Hirohashi Y, Sato N (2013). Preferential expression of cancer/testis genes in cancer stem-like cells: proposal of a novel sub-category, cancer/testis/stem gene. *Tissue Antigens* 81, 428-434.
- 5 Yoshida N, Abe H, Ohkuri T, Wakita D, Sato M, Noguchi D, Miyamoto M, Morikawa T, Kondo S, Ikeda H, Nishimura T (2006). Expression of the MAGE-A4 and NY-ESO-1 cancer-testis antigens and T-cell infiltration in non-small cell lung carcinoma and their prognostic significance. *Int. J Oncol* 28, 1089-1098.
- Zhang Y, Stroobant V, Russo V, Boon T, van der Bruggen P (2002). A MAGE-A4 peptide presented by HLA-B37 is recognized on human tumors by cytolytic T lymphocytes. *Tissue Antigens* 60, 365-371.
- 10 Zimmermann AK, Imig J, Klar A, Renner C, Korol D, Fink D, Stadlmann S, Singer G, Knuth A, Moch H, Caduff R (2013). Expression of MAGE-C1/CT7 and selected cancer/testis antigens in ovarian borderline tumours and primary and recurrent ovarian carcinomas. *Virchows Arch.* 462, 565-574.

LISTARE SECVENȚE

<110> Immatics Biotechnologies GmbH

<120> Peptide pentru utilizare în imunoterapia împotriva cancerului pulmonar fără celule mici și a cancerului pulmonar cu celule mici

<130> I32925WO

<150> GB 1604458.8

<151> 2016-03-16

<150> US 62/308,944

<151> 2016-03-16

<160> 25

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Lys Val Leu Glu His Val Val Arg Val

1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Lys Val Leu Glu His Val Val Arg Leu

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Lys Val Leu Glu His Val Val Arg Ala

1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Lys Val Leu Glu His Val Val Arg Ile

1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Lys Leu Leu Glu His Val Val Arg Val

1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 6
Lys Leu Leu Glu His Val Val Arg Leu
1 5
<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 7
Lys Leu Leu Glu His Val Val Arg Ala
1 5
<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 8
Lys Leu Leu Glu His Val Val Arg Ile
1 5
<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 9
Lys Ala Leu Glu His Val Val Arg Val
1 5
<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 10
Lys Ala Leu Glu His Val Val Arg Leu
1 5
<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 11
Lys Ala Leu Glu His Val Val Arg Ala
1 5
<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 12
Lys Ala Leu Glu His Val Val Arg Ile
1 5
<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 13
Tyr Leu Leu Glu His Val Val Arg Val
1 5
<210> 14
<211> 9
<212> PRT

<213> Homo sapiens
<400> 14
Tyr Leu Leu Glu His Val Val Arg Leu
1 5
<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 15
Tyr Leu Leu Glu His Val Val Arg Ala
1 5
<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 16
Tyr Leu Leu Glu His Val Val Arg Ile
1 5
<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 17
Tyr Ala Leu Glu His Val Val Arg Val
1 5
<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 18
Tyr Ala Leu Glu His Val Val Arg Leu
1 5
<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 19
Tyr Ala Leu Glu His Val Val Arg Ala
1 5
<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 20
Tyr Ala Leu Glu His Val Val Arg Ile
1 5
<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 21
Tyr Val Leu Glu His Val Val Arg Val
1 5
<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 22
Tyr Val Leu Glu His Val Val Arg Leu

1 5
 <210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 23
 Tyr Val Leu Glu His Val Val Arg Ala
 1 5
 <210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 24
 Tyr Val Leu Glu His Val Val Arg Ile
 1 5
 <210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa can be Lys or Tyr
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa can be Val, Leu or Ala
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa can be Val, Leu, Ala or Ile
 <400> 25
 Xaa Xaa Leu Glu His Val Val Arg Xaa
 1 5
 - 2 -

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- Z. Y. WU ET AL: "Identification of a Novel CD8+ T Cell Epitope Derived from Cancer-Testis Antigen MAGE-4 in Oesophageal Carcinoma", SCANDINAVIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 74, no. 6, 14 December 2011 (2011-12-14), pages 561-567, XP055364875, GB ISSN: 0300-9475, DOI: 10.1111/j.1365-3083.2011.02606.x
- EP-A1- 1 306 431
- ZHENG-CAI JIA ET AL: "Identification of Two Novel HLA-A* 0201-Restricted CTL Epitopes Derived from MAGE-A4", CLINICAL & DEVELOPMENTAL IMMUNOLOGY, vol. 2010, 1 January 2010 (2010-01-01), pages 1-7, XP055364879, US ISSN: 1740-2522, DOI: 10.1155/2010/567594
- EP-A1- 2 119 726
- EP-A1- 2 752 198
- WO-A1-01/41741
- WO-A1-2011/066265
- WO-A1-2015/172843
- WO-A2-2006/091734
- WO-A2-2015/063302
- CN-A- 101 870 725

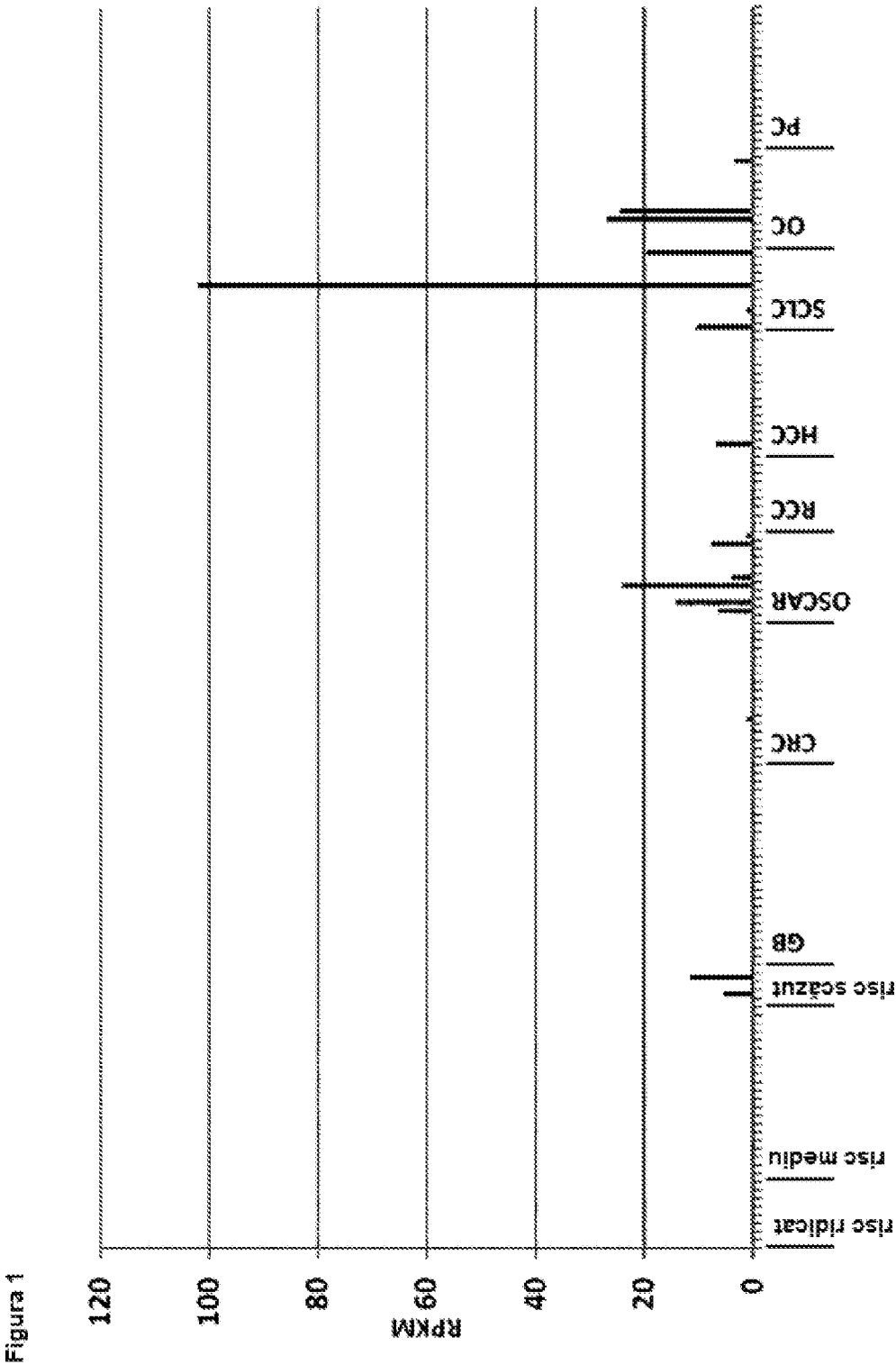
(57) Revendicări:

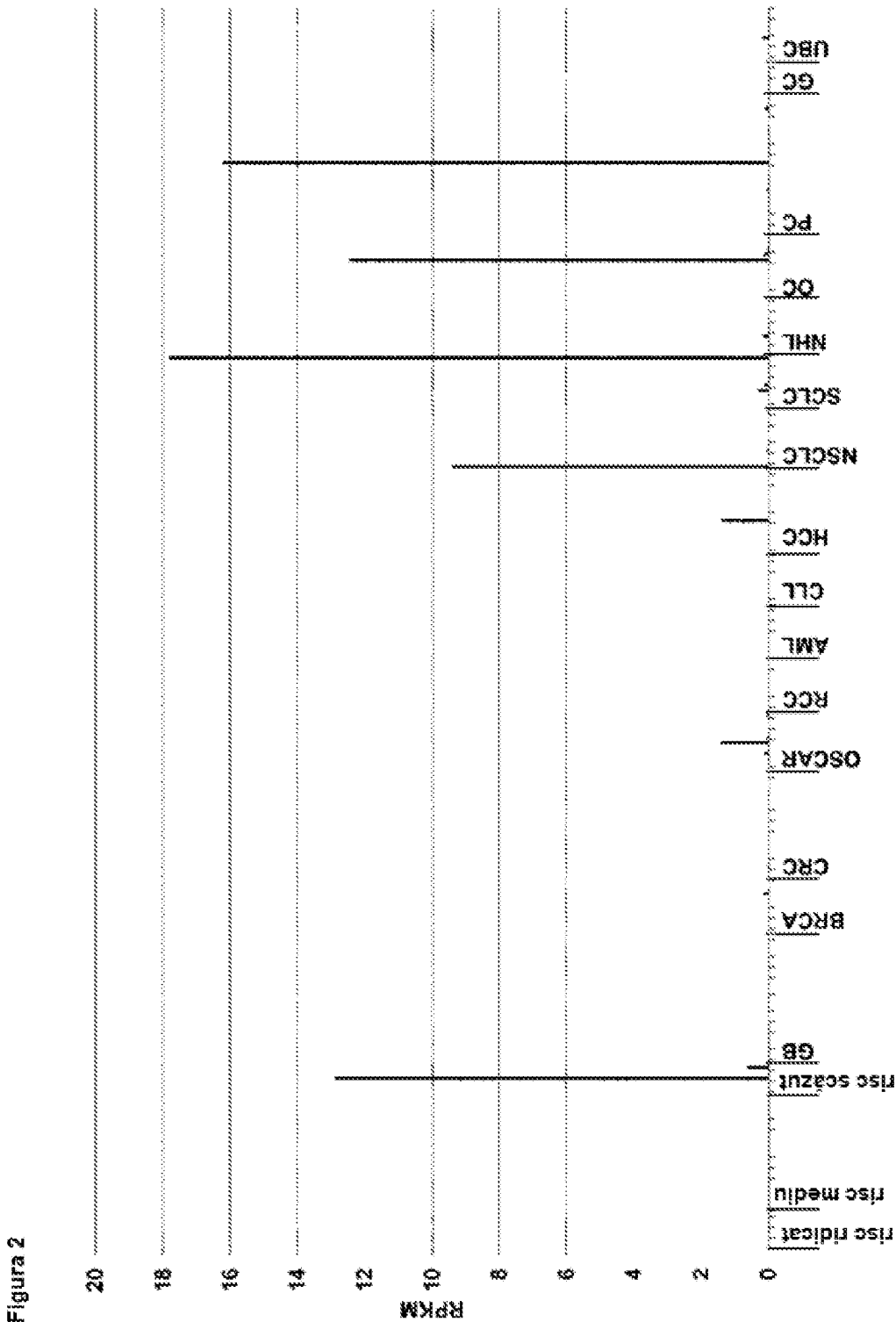
1. O peptidă constând din secvența de aminoacizi a SECV ID NR. 1 (KVLEHVVRV), sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia, pentru utilizare în tratamentul cancerului, în care respectivul cancer este selectat dintre cancel pulmonar fără celule mici și cancer pulmonar cu celule mici.

2. Receptor de celule T, de preferință un receptor de celule T recombinante, solubil sau legat de membrană, care este reactiv cu un ligand HLA, în care respectivul ligand constă dintr-o peptidă conform revendicării 1, pentru utilizare în tratamentul cancerului pulmonar fără celule mici sau al cancerului pulmonar cu celule mici.

3. Anticorp, în special un anticorp solubil sau legat de membrană, care recunoaște în mod specific peptida conform revendicării 1 atunci când se leagă la o moleculă MHC pentru utilizare în tratamentul cancerului pulmonar fără celule mici sau al cancerului pulmonar cu celule mici.

4. Compoziție farmaceutică care cuprinde cel puțin un ingredient activ selectat din grupul constând din peptida conform revendicării 1 sau anticorpul conform revendicării 3 sau receptorul de celule T conform revendicării 2 și un purtător acceptabil farmaceutic și, opțional, suplimentar acceptabil farmaceutic, excipienți și/sau stabilizatori pentru utilizare în tratamentul cancerului, în care respectivul cancer este selectat dintre cancerul pulmonar fără celule mici și cancerul pulmonar cu celule mici.





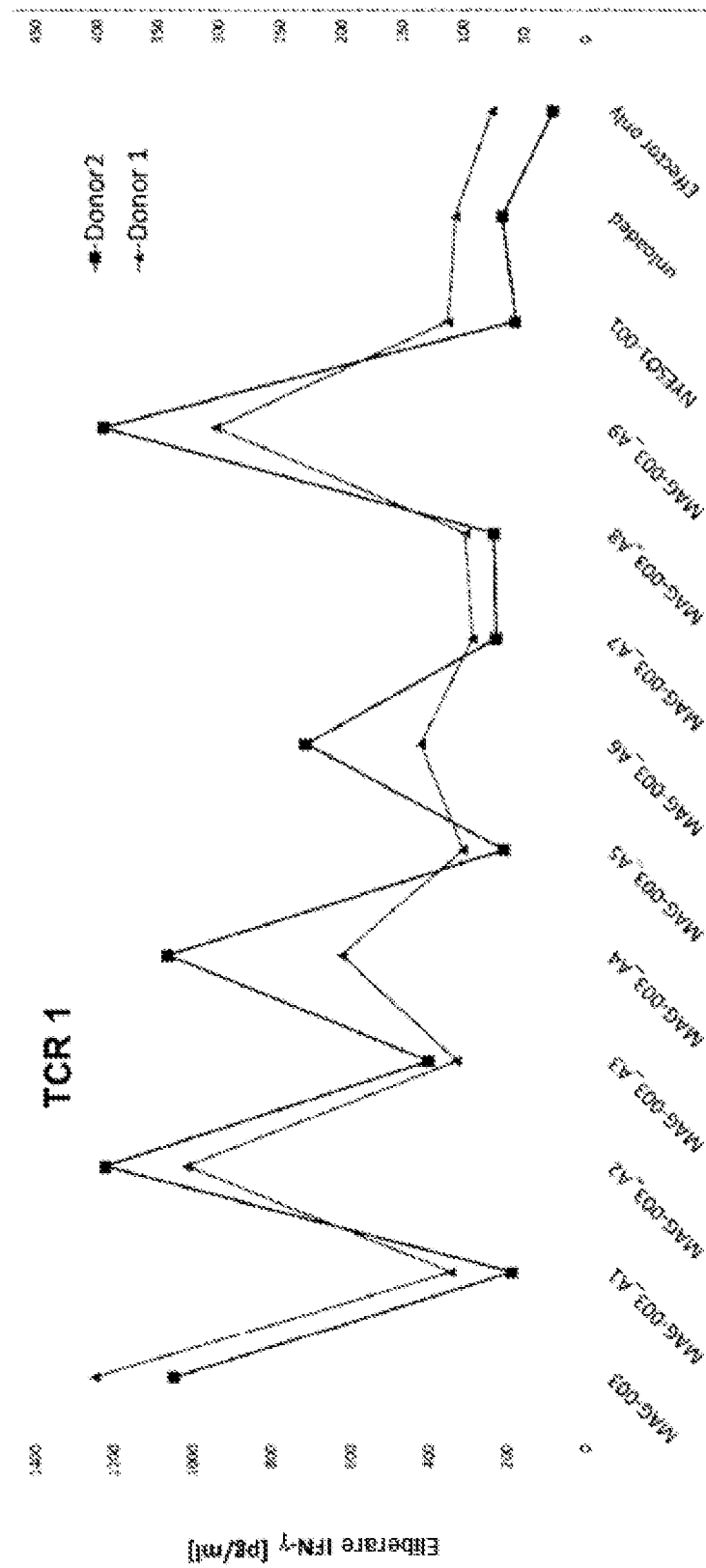
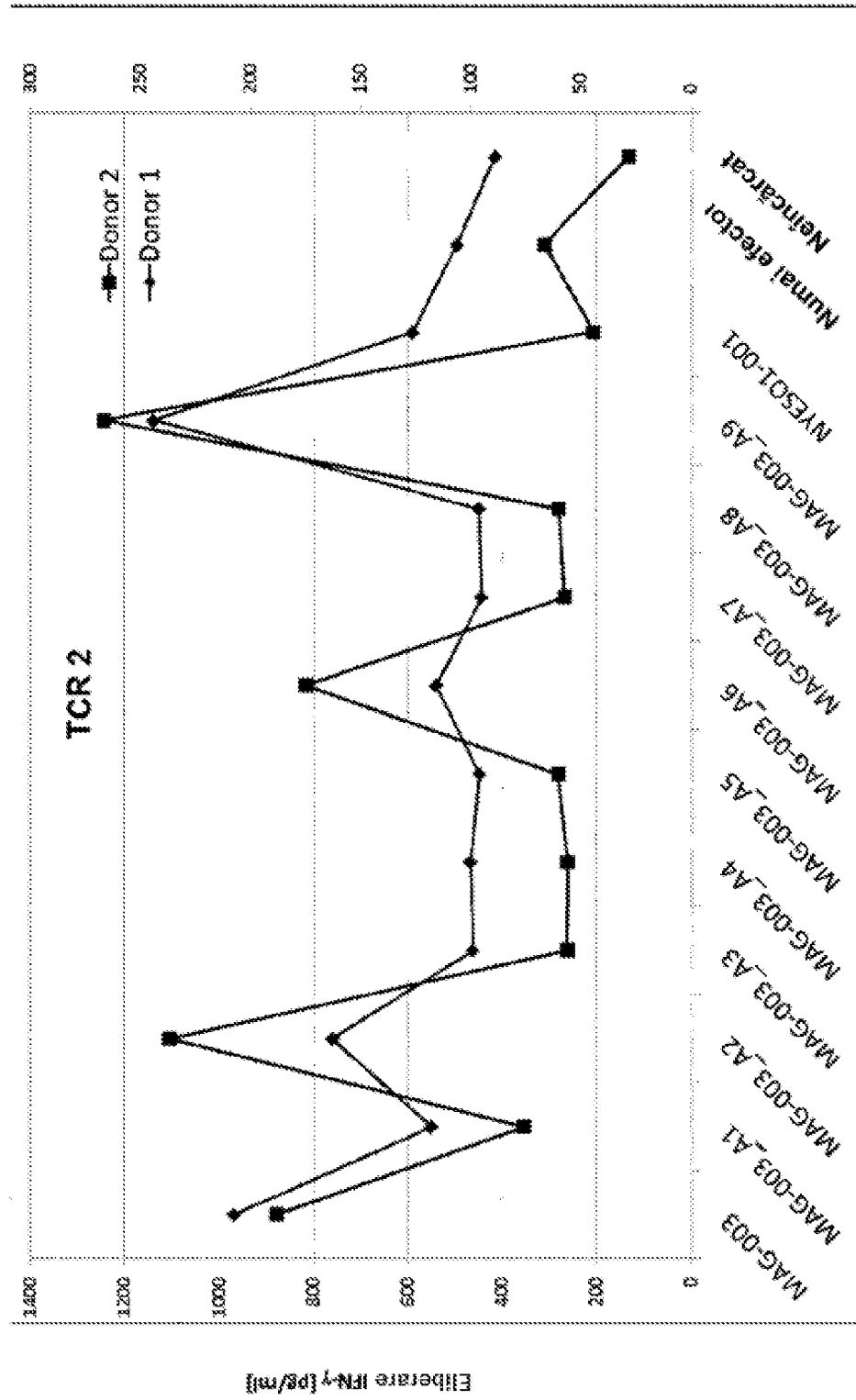


Figura 3

Figura 4



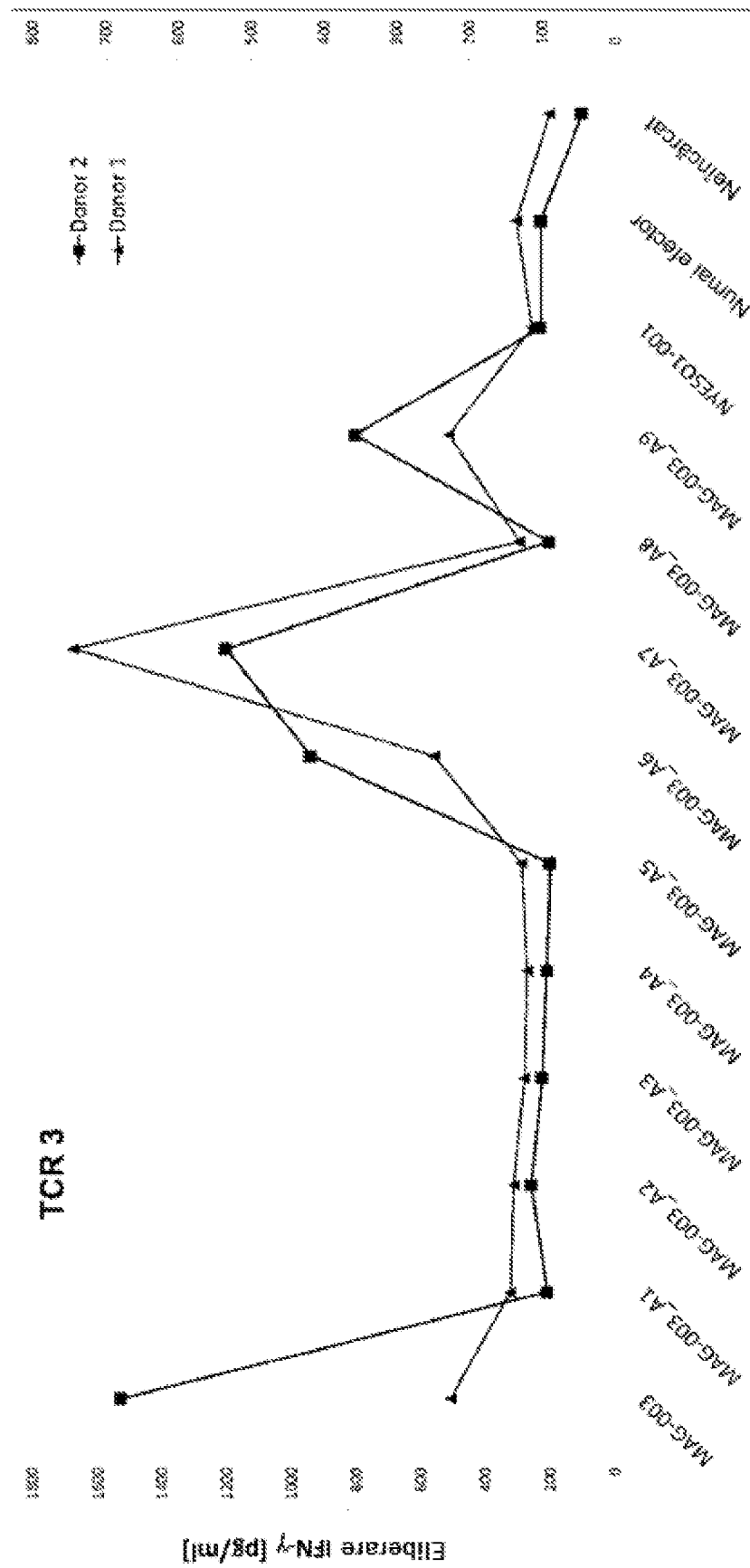


Figure 5

Figure 6

