



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.12.13

(21) Номер заявки
201791925

(22) Дата подачи заявки
2016.03.24

(51) Int. Cl. **A61K 39/00** (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

(54) НОВЫЕ ПЕПТИДЫ И КОМБИНАЦИИ ПЕПТИДОВ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ИММУНОТЕРАПИИ НЕСКОЛЬКИХ ВИДОВ ОПУХОЛЕЙ

(31) 62/139,189; 1505305.1

(32) 2015.03.27

(33) US; GB

(43) 2018.02.28

(86) PCT/EP2016/056557

(87) WO 2016/156202 2016.10.06

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ИММАТИКС БАЙОТЕКНОЛОДЖИЗ
ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:
**Мар Андреа, Стиверманн Ли,
Вайншенк Тони, Шоор Оливер,
Фрицше Дженс (DE), Сингх Харприт
(US)**

(74) Представитель:
**Угрюмов В.М., Лыу Т.Н., Гизатуллина
Е.М., Глухарёва А.О., Карпенко О.Ю.,
Строкова О.В., Христофоров А.А.
(RU)**

(56) MICHAL BASSANI-STERMBERG ET AL.: "Mass Spectrometry of Human Leukocyte Antigen Class I Peptidomes Reveals Strong Effects of Protein Abundance and Turnover on Antigen Presentation", MOLECULAR & CELLULAR PROTEOMICS, vol. 14, no. 3, 2 March 2015 (2015-03-02), pages 658-673, XP055272560, ISSN: 1535-9476, DOI: 10.1074/mcp.M114.042812, figures 1-6; tables S1, S2
D. BOURDETSKY ET AL.: "The nature and extent of contributions by defective ribosome products to the HLA peptidome", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 111, no. 16, 22 April 2014 (2014-04-22), pages E1591-E1599, XP055272544, US ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1321902111, figures 1-5; table S1

WO-A1-2010102157

US-A1-2007248628

STICKEL S. JULIANE ET AL.: "HLA class I ligandome analysis in Acute Myeloid Leukemia-Novel-T-Cell epitopes for peptide-based immunotherapy", INTERNET CITATION, 15 November 2013 (2013-11-15), pages 1-2, XP002744388, ISSN: 0006-4971 Retrieved from the Internet: URL: <http://www.bloodjournal.org/content/122/21/5431.full.pdf> [retrieved on 2015-09-08], the whole document

SEBASTIAN P. HAEN ET AL.: "The repertoire of human tumor-associated epitopes - identification and selection of antigens and their application in clinical trials", CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY, vol. 25, no. 2, 1 April 2013 (2013-04-01), pages 277-283, XP055212257, ISSN: 0952-7915, DOI: 10.1016/j.coi.2013.03.007, the whole document

(57) Изобретение относится к пептидам, белкам, нуклеиновым кислотам и клеткам для применения в иммунотерапевтических методах. В частности, настоящее изобретение относится к иммунотерапии рака. Настоящее изобретение относится далее к опухолеассоциированным пептидным эпитопам Т-клеток, в отдельности или в комбинации с другими опухолеассоциированными пептидами, которые могут, например, служить в качестве активных фармацевтических ингредиентов вакцинных композиций, стимулирующих противоопухолевые иммунные ответы, или стимулировать Т-клетки ex vivo с их перенесением в организм пациента. Пептиды, связанные с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС), или пептиды в отдельности могут быть также мишенями антител, растворимых Т-клеточных рецепторов и других связывающих молекул.

Настоящее изобретение относится к пептидам, белкам, нуклеиновым кислотам и клеткам для применения в иммунотерапевтических методах. В частности, настоящее изобретение относится к иммунотерапии рака. Настоящее изобретение относится далее к опухолеассоциированным пептидным эпитопам Т-клеток, в отдельности или в комбинации с другими опухолеассоциированными пептидами, которые могут, например, служить в качестве активных фармацевтических ингредиентов вакцинных композиций, стимулирующих противоопухолевые иммунные ответы, или стимулировать Т-клетки *ex vivo* с последующим их перенесением в организм пациента. Пептиды, связанные с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС), или пептиды в отдельности могут быть также мишенями антител, растворимых Т-клеточных рецепторов и других связывающих молекул.

Настоящее изобретение относится к нескольким новым пептидным последовательностям и их вариантам, образованным из молекул HLA I класса человеческих опухолевых клеток, которые могут быть использованы в вакцинных композициях для вызывания противоопухолевых иммунных ответов или в качестве мишеней для разработки фармацевтически/иммунологически активных соединений и клеток.

Уровень техники

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в 2012 г. рак находился среди четырех основных неинфекционных смертельно опасных заболеваний в мире. По данным за тот же год колоректальный рак, рак молочной железы и раковые заболевания дыхательных путей находились в списке 10 наиболее распространенных причин смерти в странах с высоким уровнем доходов (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>).

Эпидемиология

Согласно оценкам, на 2012 г. приходится 14,1 млн новых случаев заболевания раком, 32,6 млн пациентов, страдающих раковыми заболеваниями (в течение 5 лет после постановки диагноза), и 8,2 млн случаев летального исхода от рака в мире (Ferlay et al., 2013; Bray et al., 2013). Внутри групп раковых заболеваний головного мозга, лейкоза и рака легких фокус настоящего изобретения в частности направлен на глиобластому (ГБ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) и острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), немелкоклеточный и мелкоклеточный рак легких (НМРЛ и МРЛ), соответственно.

Глиобластома является наиболее распространенным злокачественным заболеванием центральной нервной системы, стандартизованный по возрасту коэффициент заболеваемости которого составляет 3,19 на 100 000 жителей Соединенных Штатов Америки. Глиобластома имеет крайне неблагоприятный прогноз, при котором годовичная выживаемость составляет 35%, а 5-летняя выживаемость ниже 5%. Мужской пол, преклонный возраст и этническая принадлежность, по-видимому, являются факторами риска для глиобластомы (Thakkar et al., 2014).

ХЛЛ является наиболее распространенным видом лейкоза в западных странах, где на его долю приходится одна треть всех случаев заболевания лейкемией. Частота заболеваемости соотносима в странах Европы и США, предполагаемое количество новых случаев составляет около 16 000 в год. ХЛЛ более распространен среди европеоидного, а не африканского населения, реже встречается у людей испано-латиноамериканского происхождения и коренного населения Америки и редко у монголоидов. У людей монголоидной расы частота заболеваемости ХЛЛ в 3 раза ниже, чем у людей европеоидной расы (Gunawardana et al., 2008). Пятилетняя общая выживаемость для пациентов с ХЛЛ составляет около 79% (<http://www.cancer.net/cancer-types/leukemia-chronic-lymphocytic-cll/statistics>).

Рак легких является наиболее распространенным видом рака в мире и основной причиной смерти от рака во многих странах. Рак легких подразделяется на мелкоклеточный и немелкоклеточный рак легких. НМРЛ включает гистологические типы: аденокарцинома, плоскоклеточная карцинома и крупноклеточная карцинома, и на его долю приходится 85% всех случаев заболевания раком легких в США. Возникновение НМРЛ тесно коррелирует с распространением курения, включая курящих в настоящее время и куривших в прошлом, и, как сообщалось, пятилетняя выживаемость составляет 15% (World Cancer Report, 2014; Molina et al., 2008).

Терапия

Рак молочной железы

Стандарт лечения пациентов с раком молочной железы зависит от различных параметров: стадия опухоли, статуса рецепторов гормонов и паттерна экспрессии HER2. Стандартное лечение включает полную хирургическую резекцию опухоли с последующей лучевой терапией. Химиотерапия с применением преимущественно антрациклинов и таксанов может быть начата до или после резекции. Пациенты с HER2-положительными опухолями в дополнение к химиотерапевтическим средствам получают антитела к HER2 трастузумаб (S3-Leitlinie Mammarkarzinom, 2012). Рак молочной железы является иммунногенным видом рака, и различные виды инфильтрующих иммунных клеток в первичных опухолях обладают определенной прогностической и предсказывающей значимостью. Было проведено множество клинических исследований ранних фаз в области иммунотерапии для пациентов с раком молочной железы. Сейчас появляются клинические данные о воздействии модуляции иммунных контрольных точек с помощью ипилимумаба и других активирующих Т-клетки антител на пациентов с раком молочной железы (Emens, 2012).

Хронический лимфоцитарный лейкоз

В то время как ХЛЛ в настоящее время не поддается лечению, у многих пациентов наблюдаются лишь медленное прогрессирование заболевания или усиление симптомов. Для пациентов с клиническими симптомами или быстро прогрессирующим заболеванием имеется несколько видов лечения. Они включают химиотерапию, таргетную терапию, терапию иммунными препаратами, как, например, моноклональные антитела, химерные антигенные рецепторы (CAR) и активную иммунотерапию, а также трансплантацию стволовых клеток.

Несколько завершенных и проводимых сейчас клинических исследований основаны на применении полученных методом генной инженерии аутологичных Т-клетках, измененных с помощью химерных антигенных рецепторов (CAR), со специфичностью к CD19 (Maus et al., 2014). До сих пор лишь у малой части пациентов были выявлены поддающиеся обнаружению или стабильно присутствующие рецепторы CAR. Один частичный ответ (PR) и два полных ответа (CR) были обнаружены в исследованиях Т-клеток CAR, проведенных Porter и соавт. и Kalos и соавт. (Kalos et al., 2011; Porter et al., 2011).

Активная иммунотерапия включает следующие стратегии: генная терапия, вакцины на основе цельных модифицированных опухолевых клеток, вакцины на основе ДК и пептидов, полученных из опухолеассоциированных антигенов (ТАА).

Несколько ТАА избыточно экспрессируются клетками ХЛЛ и подходят для вакцин. Они включают фибромодулин (Mayr et al., 2005), RHAMM/CD168 (Giannopoulos et al., 2006), MDM2 (Mayr et al., 2006), hTERT (Counter et al., 1995), белок раково-эмбрионального антиген-незрелого рецептора ламинина (OFAiLRP) (Siegel et al., 2003), адипофин (Schmidt et al., 2004), сурвивин (Granziero et al., 2001), KW1 - KW14 (Krackhardt et al., 2002) и полученный из опухоли участок IgVHCDR3 (Harig et al., 2001; Carballido et al., 2012). Было проведено клиническое исследование фазы I с применением полученного из белка RHAMM пептида R3 в качестве вакцины. 5 из 6 пациентов имели поддающиеся обнаружению R3-специфические CD8+ Т-клеточные ответы (Giannopoulos et al., 2010).

Колоректальный рак

В зависимости от стадии колоректального рака (КРК), для лечения рака толстой и прямой кишки имеются различные виды стандартной терапии. Стандартные процедуры включают хирургическую операцию, лучевую терапию, химиотерапию и таргетную терапию для КРК (Berman et al., 2015a; Berman et al., 2015b).

В последних клинических исследованиях в качестве варианта лечения КРК анализируется активная иммунотерапия. Ее стратегии включают вакцинацию пептидами из опухолеассоциированных антигенов (ТАА), вакцины на основе цельных опухолевых клеток, дендритных клеток (ДК) и вирусные векторы (Koido et al., 2013).

Пептидные вакцины до сих пор были направлены на раковоэмбриональный антиген (CEA), муцин 1, EGFR, антиген плоскоклеточной карциномы, распознаваемый Т-клетками 3 (SART3), человеческий хориогонадотропин-бета (бета-ХГЧ), антиген опухоли Уильмса 1 (WT1), сурвивин-2B, MAGE3, p53, белок с доменом ring finger 43 и транслоказу внешней митохондриальной мембраны 34 (TOMM34) или имеющих мутации белок KRAS. В нескольких клинических исследованиях фазы I и II у пациентов наблюдались антигенспецифические ответы ЦТЛ или выработка антител. В отличие от иммунологических ответов многие пациенты не получают пользы от пептидных вакцин на клиническом уровне (Koido et al., 2013; Miyagi et al., 2001; Moulton et al., 2002; Okuno et al., 2011).

Вакцины на основе дендритных клеток (ДК) включают ДК, нагруженные полученными из ТАА пептидами, лизатами опухолевых клеток, апоптотическими опухолевыми клетками или опухолевой РНК или продуктами слияния ДК и опухолевых клеток. В то время как у многих пациентов во время исследований фазы I/II наблюдались специфические иммунные ответы, клиническую пользу получило лишь меньшинство пациентов (Koido et al., 2013).

Рак пищевода

Приоритетная стратегия лечения рака пищевода зависит от стадии опухоли и ее места расположения, гистологического типа и патологического состояния пациента. Схемы химиотерапевтического лечения включают оксалиплатин в комбинации с флуороурацилом, карбоплатин в комбинации с паклитакселем, цисплатин в комбинации с флуороурацилом, FOLFOX и цисплатин в комбинации с иринотеканом. Лечение пациентов с HER2-положительными опухолями должно осуществляться в соответствии с рекомендациями для рака желудка, поскольку в наличии имеется лишь ограниченное количество данных рандомизированных клинических испытаний таргетной терапии рака пищевода (Stahl et al., 2013).

Имеются скудные данные о иммунотерапевтических подходах при лечении рака пищевода, поскольку было проведено лишь ограниченное количество клинических исследований ранней фазы. Вакцину, состоящую из трех пептидов, полученных из трех различных раково-тестикулярных антигенов (протеинкиназа ТТК, комплекс лимфоцитарного антигена 6 locus К и инсулиноподобный фактор роста-связывающий мРНК белок 3 (IGF)-II), вводили пациентам с распространенным раком пищевода в рамках клинического исследования фазы I с получением результатов умеренного характера. Введение внутрь опухоли активированных Т-клеток после их стимуляции in vitro аутологичными злокачественными клетками вызывало полные или частичные ответы опухоли у четырех из одиннадцати пациентов в исследо-

вании I/II фазы (Toomey et al., 2013).

Рак желудка

Рак желудка (РЖ) развивается в клетках, выстилающих слизистую оболочку, и распространяется во время роста во внешние слои. Применяются четыре стандартных способа лечения. Лечение рака желудка может включать эндоскопическую или хирургическую резекцию, химиотерапию, лучевую терапию или химиолучевую терапию (Leitlinie Magenkarzinom, 2012).

Применяемые сейчас схемы лечения распространенного РЖ малоэффективны, приводя к низкому уровню 5-летней выживаемости. Иммунотерапия могла бы стать альтернативным подходом в целях улучшения выживаемости пациентов с РЖ. Адоптивный перенос опухолеассоциированных лимфоцитов и цитокин-индуцированных киллерных клеток, вакцины на основе пептидов, мишенью которых являются HER2/neu, MAGE-3 или рецептор сосудистого эндотелиального фактора роста 1 и 2, и вакцины на основе дендритных клеток, мишенью которых является HER2/neu, показали многообещающие результаты в рамках клинических исследований РЖ. Ингибирование иммунных контрольных точек и полученные методом генной инженерии Т-клетки могут стать дополнительными вариантами лечения, сейчас они проходят оценку в доклинических и клинических исследованиях (Matsueda and Graham, 2014).

Глиобластома

Существует крайне мало вариантов лечения глиобластомы (ВОЗ IV степени).

Было проведено исследование различных иммунотерапевтических подходов для лечения глиобластомы, включая ингибирования иммунных контрольных точек, вакцинацию и адоптивный перенос полученных методом генной инженерии Т-клеток.

Сейчас проводятся исследования различных стратегий вакцинации для пациентов, больных глиобластомой, в том числе вакцин на основе пептидов, белков теплового шока, аутологических вакцин на основе опухолевых клеток, дендритных клеток и вирусных белков. Чтобы вызвать противоопухолевый иммунный ответ у пациентов с глиобластомой в данных подходах используются пептиды, полученные из глиобластома-ассоциированных белков, таких как рецептор эпидермального фактора роста вариант III (EGFRvIII) или белков теплового шока или дендритных клеток, обработанных лизатом аутологических опухолевых клеток или компонентами цитомегаловируса. Несколько из этих исследований обнаружили хорошие профили безопасности и переносимости, а также показали многообещающие результаты по эффективности.

Адоптивный перенос генетически измененных Т-клеток является дополнительным иммунотерапевтическим подходом к лечению глиобластомы. В настоящее время в различных клинических исследованиях производят оценку безопасности и эффективности Т-клеток, несущих химерный антигенный рецептор HER2, рецептора альфа 2 ИЛ-13 и EGFRvIII (Ampie et al., 2015).

Рак печени

Лечение пациентов с заболеванием зависит от стадии опухоли в момент постановки диагноза и общего состояния печени. Химиотерапия против ГМК включает комбинации из доксорубицина, 5-фторурацила и цисплатина для системной терапии и доксорубицина, флоксуридина и митомицина С для инфузии в печеночную артерию. Однако большинство ГМК обладают высокой резистентностью к химиотерапевтическим средствам (Enguita-German and Fortes, 2014).

Варианты лечения при распространенной нерезектабельной ГМК ограничены применением сорафениба, мультитирозинкиназного ингибитора (Chang et al., 2007; Wilhelm et al., 2004). Сорафениб является единственным препаратом системного действия, который, как было подтверждено, увеличивает выживаемость примерно на 3 месяца, и на сегодняшний день представляется собой единственный экспериментальный вариант лечения для таких пациентов (Chapiro et al., 2014; Llovet et al., 2008).

В последнее время было проведено небольшое число клинических исследований применения иммунотерапии при лечении ГМК. Для активации субпопуляций иммунных клеток и(или) повышения иммуногенности опухоли использовали цитокины (Reinisch et al., 2002; Sangro et al., 2004). Другие клинические исследования были сфокусированы на инфузии опухоли-инфильтрующих лимфоцитов или активированных лимфоцитов периферической крови (Shi et al., 2004; Takayama et al., 1991; Takayama et al., 2000).

До сих пор было проведено небольшое число клинических исследований терапевтической вакцинации. Butterfield и соавторы провели два исследования с применением пептидов, полученных из альфа-фетопротейна (АФП), в качестве вакцины или дендритных клеток, нагруженных ex vivo пептидами из АФП (Butterfield et al., 2003; Butterfield et al., 2006). В двух различных исследованиях аутологичные дендритные клетки (ДК) нагружали ex vivo аутологичным опухолевым лизатом (Lee et al., 2005) или лизатом клеток гепатобластомы линии HepG2 (Palmer et al., 2009). До сих пор клинические исследования вакцин показали лишь незначительное улучшение клинических исходов.

Меланома

Стандартным способом лечения меланомы является полная хирургическая резекция вместе с окружающей здоровой тканью. Варианты терапии включают монохимиотерапию, полихимиотерапию и таргетные виды терапии со специфическими ингибиторами (S3-Leitlinie Melanom, 2013).

Уже была проведена оценка нескольких различных подходов по вакцинации пациентов с распро-

страненной меланомой. До сих пор клинические исследования фазы III дали скорее неутешительные результаты, и стратегии вакцинации, несомненно, необходимо улучшать. Поэтому новые клинические исследования, как, например, исследование ГМ-КСФ OncoVEX или исследование DERMA, направлены на улучшение клинической эффективности без снижения переносимости (<http://www.cancerresearchuk.org>).

Адоптивный перенос Т-клеток проявляет многообещающий потенциал для лечения меланомы поздних стадий. Культивированные *in vitro* аутологичные опухоль-инфильтрующие лимфоциты, а также Т-клетки, несущие Т-клеточный рецептор с высокой аффинностью к раково-тестикулярному антигену NY-ESO-1, оказывают существенное полезное воздействие и обладают низкой токсичностью при введении пациентам с меланомой. К сожалению, Т-клетки с Т-клеточными рецепторами с высокой аффинностью к меланоцит-специфическим антигенам MART1 и gp100 и к раково-тестикулярному антигену MAGEA3 в рамках клинических исследований вызывали значительные токсические эффекты. Таким образом, адоптивный перенос Т-клеток обладает высоким терапевтическим потенциалом, однако требуется дальнейшее повышение безопасности и переносимости данных способов лечения (Phan and Rosenberg, 2013; Hinrichs and Restifo, 2013).

Немелкоклеточный рак легких

Вид лечения определяется типом (мелкоклеточный или немелкоклеточный) и стадией ракового заболевания и включают хирургическое вмешательство, лучевую терапию, химиотерапию, а также таргетную терапию биологическими препаратами, такими как бевацизумаб, эрлотиниб и gefитиниб (S3-Leitlinie Lungenkarzinom, 2011).

В целях расширения числа возможных способов лечения НМРЛ были изучены или продолжают исследоваться различные иммунотерапевтические подходы. В то время как с помощью вакцинации L-BLP25 или MAGEA3 у пациентов с НМРЛ не удалось продемонстрировать преимуществ по выживаемости, при введении вакцин, одна вакцина на основе аллогенной клеточной линии показала многообещающие результаты в рамках клинических исследований. Кроме того, в настоящий момент ведутся клинические исследования вакцин, мишенями которых являются ганглиозиды, рецептор эпидермального фактора роста и несколько других антигенов. Альтернативная стратегия для усиления противоопухолевого Т-клеточного ответа пациента состоит в блокировке ингибирующих Т-клеточных рецепторов или их лигандов специфическими антителами. Терапевтический потенциал нескольких из этих антител, включая ипилимумаб, ниволумаб, пембролизумаб, MPDL3280A и MEDI-4736, при НМРЛ оцениваются сейчас в клинических исследованиях (Reinmuth et al., 2015).

Рак яичников

Хирургическая резекция является приоритетной терапией как на ранней, так и на поздней стадии рака яичника (S3-Leitlinie maligne Ovarialtumore, 2013).

Иммунотерапия, по-видимому, является многообещающей стратегией по усовершенствованию лечения пациентов с раком яичника, поскольку присутствие провоспалительных опухоль-инфильтрующих лимфоцитов, в частности CD8-положительных Т-клеток, коррелирует с благоприятным прогнозом, и Т-клетки, специфические для опухолиассоциированных антигенов могут быть выделены из раковой ткани.

В связи с этим проводится интенсивная научная работа по исследованию различных видов иммунотерапии рака яичника. Значительное число доклинических и клинических исследований уже было проведено, и дальнейшие исследования ведутся сейчас. Имеются клинические данные для терапии с применением цитокинов, вакцинации, лечения моноклональными антителами, адоптивного клеточного переноса и иммуномодуляции.

Клинические исследования вакцинации I и II фазы с применением одного или нескольких пептидов, полученных из нескольких опухолиассоциированных белков (Her2/neu, NY-ESO-1, p53, опухоль Уильмса-1) или цельных опухолевых антигенов, полученных из аутологичных опухолевых клеток, продемонстрировали хорошие профили безопасности и переносимости, однако лишь низкую до умеренной клиническую эффективность.

Адоптивный перенос иммунных клеток привел в неоднородным результатам в рамках клинических исследований. Адоптивный перенос аутологичных, культивированных *in vitro* опухоль-инфильтрующих Т-клеток, как было показано в пилотном исследовании, является многообещающим подходом. Напротив, перенос Т-клеток с химерным антигенным рецептором, специфичным к рецептору фолата альфа, не приводил к значимому клиническому ответу в рамках исследования I фазы. Дендритные клетки, обработанные лизатом опухолевых клеток или опухолиассоциированными белками *in vitro*, как было показано, усиливают противоопухолевый Т-клеточный ответ при переносе, тем не менее степень активации Т-клеток не коррелировала с клинической эффективностью. В рамках исследования II фазы перенос естественных киллерных клеток вызывал значительные токсические эффекты.

Истинному противоопухолевому иммунитету, а также иммунотерапии препятствует иммуносупрессивное микроокружение опухоли. Чтобы преодолеть это препятствие, проводятся испытания иммуномоделирующих препаратов, таких как циклофосфамид, антитела к CD25 и пегилированный липосомальный доxorubicin в комбинации с иммунотерапией. Наиболее достоверные данные имеются в настоящий момент для ипилимумаба, антитела к CTLA4, усиливающего активность Т-клеток. Ипилимумаб, как было показано, оказывает существенное противоопухолевое воздействие на пациентов с раком яичника (Mantia-Smaldone et al., 2012).

Рак поджелудочной железы

Существует крайне мало вариантов лечения пациентов с раком поджелудочной железы. Одной существенной проблемой для эффективности лечения обычно является поздняя стадия опухоли при постановке диагноза.

Сейчас проводятся исследования вакцинационных стратегий в качестве дальнейшей инновационной и многообещающей альтернативы для лечения рака поджелудочной железы. Основанные на пептидах вакцины, мишенями которых являются мутации гена KRAS, реактивная теломераза, гастрин, сурвивин, CEA и MUC1 уже были оценены в рамках клинических исследований, дав отчасти многообещающие результаты. Кроме того, клинические исследования вакцин на основе дендритных клеток, аллогенных ГМ-КСФ-секретирующих вакцин и препарата альгенпантусель-L у пациентов с раком поджелудочной железы выявили положительные влияния иммунотерапии. Сейчас ведутся дополнительные клинические исследования, изучающие далее эффективность различных протоколов вакцинации (Salman et al., 2013).

Рак предстательной железы

Стратегия лечения рака предстательной железы в основном зависит от стадии рака. При локально-ограниченном раке предстательной железы без метастазов варианты лечения включают активное наблюдение (ожидание и наблюдение), полную хирургическую резекцию предстательной железы и местное применение высокодозной лучевой терапии совместно с брахитерапией или без нее (S3-Leitlinie Prostatakarzinom, 2014).

Основанная на дендритных клетках вакцина "сипулейцел-Т" стала первой противораковой вакциной, одобренной Управлением по контролю за продуктами питания и лекарственными средствами США (FDA). В связи с положительным влиянием на выживаемость пациентов с кастрационно-резистентным раком предстательной железы (КР РПЖ) множество усилий прилагается для разработки дальнейших иммунотерапевтических методов. Что касается стратегий вакцинации, то многообещающие результаты в рамках различных клинических исследований показали пептидная вакцина на основе простат-специфического антигена (PSA)-TRICOM, персонализированная пептидная вакцина PPV, вакцина на основе ДНК рTVG-HP, вакцина на основе цельных клеток, экспрессирующих ГМ-КСФ, GVAX. Кроме того, вакцины на основе дендритных клеток, помимо сипулейцел-Т, а именно BPX-101 и DCVAC/Pa, как было показано, вызывают клинические ответы у пациентов с раком предстательной железы. Ингибиторы иммунных контрольных точек, такие как ипилимумаб и ниволумаб, в настоящее время проходят оценку в рамках клинических исследований в качестве монотерапии, а также в комбинации с другими методами лечения, включая антиандрогенную терапию, местную лучевую терапию, PSA-TRICOM и GVAX.

Исследования иммуномодулирующего средства тасквинимод, которое значительно уменьшало прогрессирование и повышало выживаемость без прогрессирования в рамках клинического исследования II фазы, сейчас продолжаются на III фазе. Леналидомид, другой иммуномодулятор, вызывал многообещающие эффекты в клинических исследованиях ранних фаз, однако не улучшил выживаемость на III фазе клинического исследования. Несмотря на эти неутешительные результаты, сейчас проводятся дальнейшие клинические испытания леналидомида (Quinn et al., 2015).

Почечно-клеточная карцинома

Первичное лечение наиболее часто представляет собой частичное или полное удаление пораженной(ых) почки(почек) и остается основным элементом радикального лечения (Rini et al., 2008). В качестве терапии первой линии пациентов с неблагоприятным прогностическим баллом согласно руководству, разработанному несколькими организациями и обществами по борьбе с раковыми заболеваниями, рекомендуются ингибиторы рецепторной тирозинкиназы (ИТК) сунитиниб и пазопаниб, моноклональное антитело бевацизумаб в комбинации с интерфероном-α (ИНФ-альфа) и ингибитором mTOR-киназы темсиролимус. На основании руководств, разработанных Национальной комплексной онкологической сетью США (NCCN), а также Европейской ассоциацией урологов (EAU) и Европейским обществом медицинской Онкологии (ESMO), в качестве терапии второй линии для пациентов с ПКК, для которых лечение цитокинами (ИНФ-альфа, ИЛ-2) оказалось неэффективным, рекомендуются ИТК сорафениб, пазопаниб или, в последнее время, акситиниб. В руководстве NCCN в этих условиях рекомендуется также применение сунитиниба (высокий уровень очевидности согласно категории I NCCN).

Известная иммуногенность ПКК обуславливает применение иммунотерапии и противораковых вакцин при распространенной ПКК. Интересная корреляция между экспрессией лимфоцитов PD-1 и распространенной ПКК, степенью злокачественности и прогнозом течения, а также селективной экспрессией PD-L1 опухолевыми клетками ПКК и ее потенциальной ассоциацией с худшими клиническими исходами, привели к разработке новых средств на основе антител к PD-1/PD-L1 в отдельности или в комбинации с антиангиогенными лекарственными средствами или другими иммунотерапевтическими подходами для лечения ПКК (Massari et al., 2015). Для ПКК поздних стадий в рамках клинического исследования противораковой вакцины III фазы TRIST проводится оценка того, продлевается ли выживаемость пациентов с ПКК локально-распространенной или метастатической стадии при лечении TroVax (вакциной с применением опухолеассоциированного антигена, 5T4, с поксвирусным вектором) в дополнение к стандартной терапии первой линии. Медиана выживаемости не была достигнута ни в одной из групп с

399 пациентами (54%), продолжающих исследование, тем не менее анализ данных подтверждает полученные ранее клинические результаты, демонстрируя, что вакцина TruVax является иммунологически активной, и что существует корреляция между интенсивностью ответа на 5T4-специфические антитела и улучшением выживаемости. Далее проводятся несколько исследований пептидных вакцин с применением эпитопов, избыточно экспрессируемых клетками ПКК.

Исследовались различные подходы по использованию противоопухолевых вакцин. Клинические исследования применения подходов на основе цельных опухолевых клеток, включая лизаты из опухолевых клеток, гибриды дендритных опухолевых клеток и цельных опухолевых РНК, были проведены для пациентов с ПКК. В некоторых из этих исследований сообщалось о ремиссии опухолевых очагов (Avigan et al., 2004; Holtl et al., 2002; Marten et al., 2002; Su et al., 2003; Wittig et al., 2001).

Мелкоклеточный рак легких

Лечение и прогнозирование МРЛ сильно зависит от стадии, на которой был поставлен диагноз. Определение стадий МРЛ на основе клинических результатов более распространено, чем определение патологических стадий. При определении стадии по клиническим признакам используются результаты физического обследования, различные методы визуализации и биопсии. В рамках стандартной химиотерапии МРЛ применяется либо этопозид, либо иринотекан в комбинации с цисплатином или карбоплатином (American Cancer Society, 2015; S3-Leitlinie Lungenkarzinom, 2011).

Иммунотерапия представляет собой широко исследованную область терапии рака. Большое количество подходов используются при лечении МРЛ. Цель одного из подходов - блокировка CTLA-4, супрессора естественного иммунитета человека. Ингибирование CTLA-4 направлено на стимулирование иммунной системы для борьбы с раком. Недавно была начата разработка многообещающих ингибиторов иммунных контрольных точек для лечения МРЛ. Другой подход основан на противораковых вакцинах и доступен сейчас для лечения МРЛ в рамках клинических исследований (American Cancer Society, 2015; National Cancer Institute, 2015).

Острый миелоидный лейкоз

Лечение ОМЛ подразделяют на две фазы: индукционную терапию и лечение после ремиссии/"консолидирующую терапию". Индукционная терапия применяется для инициации ремиссии, и в нее входит комбинированная химиотерапия. Консолидирующая терапия состоит из дополнительной химиотерапии или трансплантации гемопоэтических клеток (ТГК) (Shewel and Levis, 2014).

Клинические исследования рекомендуются для пациентов, которые относятся к прогностическим группам "неблагоприятная" и "промежуточная-2". Варианты лечения включают гипометилирующие препараты (НМА), такие как азацитидин или децитабин, CPX-351, который является липосомальной лекарственной формой из даунорубина и цитарабина в "оптимальном" молярном соотношении 1:5, а также воласертиб, который является ингибитором поло-киназ. Воласертиб применяется в комбинации с низкодозированным цитарабином. Несколько различных ингибиторов FLT3 могут вводиться в случае мутаций FLT3.

Сюда входят сорафениб, который вводится в комбинации 3+7, квизартиниб, более селективный ингибитор FLT3 ITD, который также ингибирует протоонкоген SKIT, креноланиб имидостаурина, неселективный ингибитор FLT3 ITD. Другой вариант лечения направлен на воздействие на CD33 с помощью препарата, конъюгированного с антителами (антитела к CD33 + калихеамицина, SGN-CD33a, антитела к CD33 + актиния-225), биспецифичных антител (распознавание CD33 + CD3 (AMG 330) или CD33 + CD16) и химерных антигенных рецепторов (CAR) (Estey, 2014).

Неходжкинская лимфома

НХЛ имеет более 60 подвидов. Три наиболее распространенных подвида - это диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (ДКВЛ, наиболее распространенный подвид), фолликулярная лимфома (ФЛ, второй наиболее распространенный подвид) и мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома/хронический лимфоцитарный лейкоз (МЛЛ/ХЛЛ, третий наиболее распространенный подвид). На долю ДКВЛ, ФЛ и МЛЛ/ХЛЛ приходится около 85% случаев НХЛ (Li et al., 2015). Treatment of NHL depends on the histologic type and stage (National Cancer Institute, 2015).

У пациентов с лимфомой может наблюдаться спонтанная регрессия опухоли. Поэтому одним из вариантов лечения является активная иммунотерапия (Palomba, 2012).

Важный способ вакцинации включает идиотипические вакцины. В-лимфоциты экспрессируют поверхностные иммуноглобулины со специфической аминокислотной последовательностью на переменных участках их тяжелой и легкой цепей, уникальной для каждого клона клетки (= идиотип, Id). Идиотип выполняет функцию опухолеассоциированного антигена.

Активная иммунизация включает введение рекомбинантного белка (Id), конъюгированного с адьювантом (гемоцианин фиссуреллы, KLH), вводимого вместе с ГМ-КСФ в качестве иммуностимулятора. Опухольеспецифический идиотип получают на основе гибридных культур или при использовании рекомбинантных ДНК (плазмид) путем экспрессии в клеточных клетках бактерий, насекомых или млекопитающих.

Рак матки

Более 80% случаев рака эндометрия имеют форму эндометриодных аденокарцином (I типа), кото-

рая ассоциируется с воздействием эстрогена и является хорошо или умеренно дифференцированной. Лечение эндометриальных карцином и рака шейки матки зависит от стадии заболевания (World Cancer Report, 2014).

Также имеется несколько иммунотерапевтических подходов, которые сейчас проходят испытания. В рамках клинического исследования I/II фазы проводили вакцинацию пациентов, страдающих от рака матки, аутологичными дендритными клетками (ДК) с введенным с помощью электропорации мРНК гена опухоли Уильмса 1 (WT1). За исключением одного случая местной аллергической реакции на адъювант, других неблагоприятных побочных реакций не наблюдалось, и у 3 из 6 пациентов наблюдался иммунологический ответ (Coosemans et al., 2013).

Аденокарцинома и холангиокарцинома желчного пузыря

Холангиокарцинома (ХК) трудно поддается лечению и обычно приводит к летальному исходу. Единственным вариантом лечения является полная резекция (R0). Данные об эффективности биологических терапии лекарственных препаратов при раковых заболеваниях желчевыводящих путей носили противоречивый характер. В настоящее время для лечения ХК исследуются лекарственные препараты, направленные на подавление роста кровеносных сосудов, такие как сорафениб, бевацизумаб, пазопаниб и регорафениб. Кроме того, в клинических исследованиях в комбинации с химиотерапией применяются лекарственные средства, мишенями которых является EGFR (American Cancer Society, 2015). В случае большинства лекарственных средств, испытанных до настоящего времени, существенного улучшения показателей по контролю заболевания и общей выживаемости не наблюдалось, тем не менее, сейчас проводятся дальнейшие исследования.

Рак желчного пузыря (РЖП) является наиболее распространенным и агрессивным злокачественным заболеванием желчевыводящих путей в мире. В связи с редкостью карцином желчевыводящих путей в целом проводится лишь немного посвященных конкретно РЖП или ХК клинических исследований, тогда как большинство из них включает все виды рака желчевыводящих путей. Это является причиной того, что способ лечения не улучшился на протяжении последних десятилетий, и резекция R0 остается до сих пор единственным вариантом радикального лечения.

Рак мочевого пузыря

Стандарт лечения рака мочевого пузыря включает хирургическую операцию, лучевую терапию, химиотерапию и иммунотерапию (National Cancer Institute, 2015).

Эффективный иммунотерапевтический подход зарекомендовал себя в лечении агрессивного немусечно-инвазивного рака мочевого пузыря (НМИ РМП). По этому способу вводится ослабленная форма бактерий коровьей туберкулезной палочки *Mycobacterium bovis* (bacillus Calmette-Guérin = БЦЖ) в виде раствора для внутривезикулярного введения. Основным эффектом от лечения БЦЖ - это значительная долгосрочная защита (вплоть до 10 лет) от рецидивов заболевания и снижение скорости прогрессирования. В принципе, лечение БЦЖ вызывает местную воспалительную реакцию, которая стимулирует клеточный иммунный ответ. Иммунный ответ на БЦЖ основан на следующих ключевых этапах: инфицирование БЦЖ уротелиальных и раковых клеток мочевого пузыря, за которым следует повышенная экспрессия антигенпрезентирующих молекул, индукция иммунного ответа, опосредованного высвобождением цитокинов, индукция противоопухолевой активности за счет привлечения различных иммунных клеток (помимо прочих, цитотоксических Т-лимфоцитов, нейтрофилов, естественных киллерных клеток и макрофагов) (Fuge et al., 2015; Gandhi et al., 2013).

Принимая во внимание серьезные побочные эффекты и высокие расходы, связанные с лечением рака, существует необходимость идентифицировать факторы, которые могут быть использованы для лечения рака вообще и гепатоклеточной карциномы (ГКК), колоректальной карциномы (КРК), глиобластомы (ГБ), рака желудка (РЖ), рака пищевода, немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), рака поджелудочной железы (РПЖ), почечноклеточной карциномы (ПКК), доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ДГПРЖ), рака предстательной железы (РПРЖ), рака яичника (РЯ), меланомы, рака молочной железы, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), карциномы клеток Меркеля (ККМ), мелкоклеточного рака легких (НМРЛ), неходжкинской лимфомы (НХЛ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), рака желчного пузыря и холангиокарциномы (РЖП, ХК), рака мочевого пузыря (РМП), рака матки (РЭМ) в частности. Также существует необходимость идентифицировать факторы, представляющие собой биомаркеры рака в целом и упомянутых выше видов рака в частности, что позволит лучше ставить диагноз, составлять прогноз и предсказывать успех лечения.

Иммунотерапия рака представляет собой вариант специфического воздействия на раковые клетки при снижении до минимума побочных эффектов. В иммунотерапии рака находит применение существование опухолеассоциированных антигенов. Актуальная классификация опухолеассоциированных антигенов (ТАА) включает следующие основные группы:

а) Раково-тестикулярные антигены: первые в истории идентифицированные ТАА, которые могут распознаваться Т-клетками, принадлежат к этому классу, называвшемуся первоначально "раково-тестикулярные антигены" (СТ), так как его члены экспрессируются в отличных по гистологической структуре опухолях человека, а среди нормальных тканей - только в сперматоцитах/сперматогониях семенника и изредка в плаценте. Так как клетки семенника не экспрессируют молекулы HLA I и II класса,

то эти антигены не могут быть распознаны Т-клетками в нормальных тканях и, поэтому, могут рассматриваться как иммунологически опухолеспецифические. Хорошо известными примерами антигенов СТ являются члены семейства MAGE и NY-ESO-1.

б) Антигены дифференциации:

Данные ТАА встречаются в опухолевых и нормальных тканях, из которых образуется опухоль. Большинство из известных антигенов дифференциации обнаружено в меланомах и нормальных меланоцитах. Многие из этих линиеспецифических белков меланоцитов участвуют в биосинтезе меланина и поэтому не являются опухолеспецифическими, однако, несмотря на это, они широко применяются в противораковой терапии. Примеры включают, но не ограничиваются тирозиназой и Melan-A/MART-1 для меланомы или ПСА для рака предстательной железы.

в) Избыточно экспрессируемые ТАА:

Гены, кодирующие широко экспрессированные ТАА, были обнаружены в различных по гистологической структуре опухолях, а также во многих нормальных тканях, в основном, с более низким уровнем экспрессии. Возможно, что многие эпитопы, процессируемые и потенциально презентруемые нормальными тканями, находятся ниже порогового уровня для распознавания Т-клетками, в то время как их избыточная экспрессия в опухолевых клетках может инициировать противораковый ответ, нарушая установившуюся ранее толерантность. Известными примерами ТАА этого класса являются Her-2/neu, сурвин, теломераза или WT1.

г) Опухолеспецифические антигены:

Данные уникальные ТАА образуются в результате мутаций нормальных генов (таких как β -катенин, CDK4 и т.д.). Некоторые из этих молекулярных изменений ассоциированы с неопластической трансформацией и(или) прогрессией. Опухолеспецифические антигены, в основном, способны индуцировать сильные иммунные ответы, не включая в себе риска аутоиммунных реакций по отношению к нормальным тканям. С другой стороны, данные ТАА в большинстве случаев релевантны только для определенной опухоли, на которой они были идентифицированы, и обычно не являются общими для многих отдельных опухолей. Опухолевая специфичность (или ассоциация) пептида может также возникнуть, если пептид образован из опухолевого (опухоль-ассоциированного) экзона в случае белков с опухолеспецифическими (ассоциированными) изоформами.

д) ТАА, образующиеся в результате аномальных пост-трансляционных модификаций: такие ТАА могут образоваться из белков, которые не являются ни специфическими, ни избыточно экспрессируемыми в опухолях, однако, несмотря на это, становятся опухолеассоциированными в ходе пост-трансляционных процессов, происходящих преимущественно в опухолях. Примеры для этого класса возникают в результате изменения характера гликозилирования, приводящему к появлению новых эпитопов в опухолях, как в случае MUC1, или при таких событиях как белковый сплайсинг во время деградации, которые могут быть опухолеспецифическими или могут не быть ими.

е) Онковирусные белки: данные ТАА являются вирусными белками и могут играть ведущую роль в онкогенном процессе, и, так как они являются чужеродными (не человеческого происхождения), они могут провоцировать Т-клеточный ответ. Примерами таких белков являются вирусные белки человеческой папилломы типа 16, Е6 и Е7, которые экспрессированы в карциноме шейки матки.

Мишенями иммунотерапии, основанной на Т-клетках, являются пептидные эпитопы, полученные из опухолеассоциированных или опухолеспецифических белков, которые презентруются молекулами главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) (МНС). Антигены, которые распознаются опухолеспецифическими Т-лимфоцитами, то есть их эпитопами, могут быть молекулами, образованными из любого класса белков, таких как ферменты, рецепторы, факторы транскрипции и т.д., которые экспрессируются и, по сравнению с не измененными клетками того же происхождения, обычно имеют повышенный уровень в клетках соответствующей опухоли.

Существуют два класса молекул МНС, МНС I класса и МНС II класса. Молекулы МНС I класса состоят из альфа-тяжелой цепи и бета-2-микроглобулина, молекулы МНС II класса - из альфа- и бета-цепи. Их трехмерная форма образует связывающую бороздку, которая используется для нековалентного взаимодействия с пептидами.

Молекулы МНС I класса встречаются на большинстве клеток, имеющих ядро. Они презентруют пептиды, образующиеся при протеолитическом расщеплении преимущественно эндогенных белков, дефектных рибосомных продуктов (DRIP) и более крупных пептидов. Однако пептиды, образованные из эндосомальных компартментов или экзогенных источников, также часто встречаются на молекулах МНС I класса. Этот неклассический способ презентации I классом в литературе называется кросс-презентацией. (Brossart and Bevan, 1997; Rock et al., 1990). Молекулы МНС II класса могут встречаться преимущественно на профессиональных антигенпрезентирующих клетках (АПК) и, в первую очередь, презентировать пептиды экзогенных или трансмембранных белков, которые поглощаются АПК, например, во время эндоцитоза и впоследствии процессируются.

Комплексы пептида и молекул МНС I класса распознаются CD8-положительными Т-клетками, несущими подходящий Т-клеточный рецептор (ТКР), тогда как комплексы пептида и молекул МНС II класса распознаются CD4-положительными хелперными Т-клетками, несущими подходящий ТКР. Хо-

рошо известно, что ТКР, пептид и МНС встречаются в стехиометрическом соотношении 1:1:1.

CD4-положительные хелперные Т-клетки играют важную роль в индуцировании и поддержании эффективных ответов CD8-положительных цитотоксических Т-клеток. Идентификация CD4-положительных Т-клеточных эпитопов, образованных из опухолеассоциированных антигенов (ТАА), может быть чрезвычайно важна для разработки фармацевтических препаратов для инициации противоопухолевых иммунных ответов (Gnjatic et al., 2003). В месте локализации опухоли Т-хелперные клетки поддерживают благоприятное для ЦТЛ цитокиновое окружение (Mortara et al., 2006) и привлекают эффекторные клетки, к примеру, ЦТЛ, естественные киллерные клетки (НК), макрофаги, гранулоциты (Hwang et al., 2007).

При отсутствии воспаления экспрессия молекул МНС II класса преимущественно ограничена клетками иммунной системы, в особенности профессиональными антигенпрезентирующими клетками (АПК), например, моноцитами, образованными из моноцитов клетками, макрофагами, дендритными клетками. Было обнаружено, что опухолевые клетки больных раком пациентов экспрессируют молекулы МНС II класса (Dengjel et al., 2006).

Удлиненные пептиды по изобретению могут выступать в качестве активных эпитопов МНС II класса.

Т-хелперные клетки, активированные эпитопами МНС II класса, играют важную роль в управлении эффекторной функцией ЦТЛ в противоопухолевом иммунитете. Эпитопы Т-хелперных клеток, инициирующие ответы Т-хелперных клеток типа TH1, поддерживают эффекторные функции CD8-положительных киллерных Т-клеток, которые включают цитотоксические функции, направленные против опухолевых клеток, проявляющих комплексы опухолеассоциированный пептид/МНС на их клеточной поверхности. Таким образом, опухолеассоциированные пептидные эпитопы Т-хелперных клеток, одни или в комбинации с другими опухолеассоциированными пептидами, могут служить в качестве активных фармацевтических ингредиентов вакцинных композиций, которые стимулируют противоопухолевые иммунные ответы.

На моделях млекопитающих животных, например, мышах, было показано, что даже при отсутствии CD8-положительных Т-лимфоцитов, CD4-положительных Т-клеток достаточно для ослабления клинических проявлений опухолей посредством ингибирования ангиогенеза при секреции интерферон-гамма (ИНФ-гамма). (Beatty and Paterson, 2001; Mumberg et al., 1999). Существуют доказательства того, что CD4 Т-клетки являются эффекторными клетками прямого противоопухолевого действия (Braumuller et al., 2013; Tran et al., 2014).

Так как конститутивная экспрессия молекул HLA II класса обычно ограничена иммунными клетками, то выделение пептидов II класса непосредственно из первичных опухолей ранее считалось невозможным. Тем не менее, Dengjel с соавторами удалось идентифицировать ряд эпитопов МНС II класса непосредственно из опухолей (WO 2007/028574, EP 1760088 B1).

Так как оба вида ответов, зависящие от CD8 и от CD4, вносят свой вклад в противоопухолевый эффект сообща и синергически, то идентификация и характеристика опухолеассоциированных антигенов, распознаваемых как CD8+ Т-клетками (лиганд: молекула МНС I класса + пептидный эпитоп), так и CD4-положительными хелперными Т-клетками (лиганд: молекула МНС II класса + пептидный эпитоп) являются важными при разработке противоопухолевых вакцин.

Для того чтобы пептид МНС I класса инициировал (вызывал) клеточный иммунный ответ, он также должен связываться с молекулой МНС. Этот процесс зависит от аллеля молекулы МНС и специфических полиморфизмов аминокислотной последовательности пептида. Пептиды, связывающиеся с МНС I класса, как правило, имеют 8-12 аминокислотных остатков в длину и обычно содержат два консервативных остатка ("якори") в их последовательности, которые взаимодействуют с соответствующей связывающей бороздкой молекулы МНС. Таким образом, каждый аллель МНС имеет "связывающий мотив", определяющий, какие пептиды могут специфически связываться со связывающей бороздкой.

В зависящей от МНС I класса иммунной реакции пептиды не только должны быть в состоянии связываться с конкретными молекулами МНС I класса, экспрессируемыми опухолевыми клетками, но они также должны затем распознаваться Т-клетками, несущими специфические Т-клеточные рецепторы (ТКР).

Для того чтобы белки были распознаны Т-лимфоцитами в качестве опухолеспецифических или -ассоциированных антигенов и чтобы они могли использоваться в терапии, должны выполняться особые предварительные требования. Антиген должен экспрессироваться преимущественно опухолевыми клетками и не экспрессироваться или экспрессироваться в сравнительно малом количестве здоровыми тканями. В предпочтительном варианте осуществления пептид должен избыточно презентироваться опухолевыми клетками по сравнению с нормальными здоровыми тканями. Кроме того, желательно, чтобы соответствующий антиген не только присутствовал в каком-либо виде опухоли, но и также имел высокую концентрацию (т.е. несколько копий соответствующего пептида на клетку). Опухолеспецифические и опухолеассоциированные антигены часто образованы из белков, напрямую задействованных в трансформации нормальной клетки в опухолевую, в связи с их функцией, например, при контроле клеточного цикла или подавлении апоптоза. Кроме того, нисходящие мишени белков, напрямую являющихся причиной трансформации, могут быть представлены в повышенном количестве и, таким образом, быть кос-

венно опухолеассоциированными. Такие косвенно опухолеассоциированные антигены могут также быть мишенями вакцинационного подхода (Singh-Jasuja et al., 2004). Необходимо, чтобы эпитопы присутствовали в аминокислотной последовательности антигена, чтобы гарантировать, что такой пептид ("иммуногенный пептид"), образованный из опухолеассоциированного антигена, ведет *in vitro* или *in vivo* к Т-клеточному ответу.

В сущности, любой пептид, способный связываться с молекулой МНС может выполнять функцию Т-клеточного эпитопа. Предварительным условием для индукции Т-клеточного ответа *in vitro* или *in vivo* является присутствие Т-клетки с соответствующим ТКР и отсутствие иммунологической толерантности к данному конкретному эпитопу.

Поэтому антигены ТАА являются отправной точкой для разработки терапии на основе Т-клеток, включающей противоопухолевые вакцины, но не ограничивающейся ими. Методы идентификации и определения характеристики ТАА обычно основаны на использовании Т-клеток, которые могут быть выделены из организма пациентов или здоровых субъектов, или же они могут быть основаны на генерировании различающихся транскрипционных профилей или различающихся паттернов экспрессии пептидов между опухолевыми и нормальными тканями. Однако идентификация генов, избыточно экспрессированных в опухолевых тканях или человеческих опухолевых клеточных линиях или же селективно экспрессированных в таких тканях или клеточных линиях, не дает точной информации об использовании антигенов, транскрибированных с данных генов, в иммунотерапии. Это обусловлено тем, что только отдельная субпопуляция эпитопов этих антигенов подходит для такого применения, так как Т-клетка с соответствующим ТКР должна быть в наличии, и необходимо, чтобы отсутствовала или была минимальной иммунологическая толерантность к этому конкретному эпитопу. Поэтому в наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения важно выбрать только те пептиды, презентруемые в избытке или селективно, против которых может быть обнаружена функциональная и(или) пролиферирующая Т-клетка. Такая функциональная Т-клетка определяется как Т-клетка, которая при стимуляции специфическим антигеном может быть распространена посредством клонирования и способна к выполнению эффекторных функций ("эффекторная Т-клетка").

В случае нацеливания на комплексы пептида с МНС специфических ТКР (например, растворимых ТКР) и антител или других связывающихся с ними молекул (каркасов) в соответствии с изобретением иммуногенность лежащих в основе пептидов является второстепенной. В таких случаях презентация является определяющим фактором.

Краткое изложение сущности изобретения

В первом аспекте настоящее изобретение относится к пептиду, включающему аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 288, или его варианту, который по меньшей мере на 77%, предпочтительно по меньшей мере на 88% гомологичен (предпочтительно по меньшей мере на 77% или по меньшей мере на 88% идентичен) последовательности с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 288, где указанный вариант связывается с МНС и/или индуцирует Т-клеточную перекрестную реакцию с указанным пептидом, или его фармацевтически приемлемой соли, где указанный пептид не является базовым полипептидом полной длины.

Тогда как наиболее важным критерием для пептида для выполнения функций мишени противораковой терапии является его избыточная презентация на первичных опухолевых тканях по сравнению с нормальными тканями, профиль экспрессии РНК соответствующего гена также может помочь выбрать подходящий пептиды. В частности, некоторые пептиды трудно поддаются обнаружению с помощью масс-спектрометрии как из-за их химических свойств, так и из-за малого числа их копий на клетках, и скрининговый подход, фокусирующийся на обнаружении презентации пептида, может оказаться безуспешным при идентификации этих мишеней. Тем не менее, эти мишени могут быть обнаружены альтернативным методом, в начале которого проводится анализ экспрессии генов в нормальных тканях, а затем оценка презентации пептидов и экспрессия генов в опухолях. Этот подход применялся в рамках настоящего изобретения с использованием данных о мРНК общедоступного банка данных (Lonsdale, 2013) в комбинации с дополнительной информацией по экспрессии генов (включая опухолевые образцы), а также данными о презентации пептидов. Если мРНК какого-либо гена практически отсутствует в нормальных тканях, в особенности в жизненно важных системах органов, использование в качестве мишеней соответствующих пептидов даже в высокоэффективных стратегиях (таких как биспецифические оптимизированные по аффинности антитела или Т-клеточные рецепторы), скорее всего, будет безопасным. Такие пептиды представляют собой интересные мишени, даже если они идентифицированы лишь на небольшом количестве (в процентном отношении) опухолевых тканей. Стандартный масс-спектрометрический анализ недостаточно чувствителен для оценки степени охвата мишеней на пептидном уровне. Вместо этого для оценки степени охвата может быть использована экспрессия опухолевой мРНК. Для обнаружения самого пептида может быть необходим целенаправленный подход с таргетной масс-спектрометрией с более высокой чувствительностью, чем рутинный скрининг, и он может привести к более точной оценке охвата на уровне презентации пептидов.

Настоящее изобретение относится далее к пептиду по настоящему изобретению, включающему последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по

SEQ ID NO: 288, или его варианту, который по меньшей мере на 77%, предпочтительно по меньшей мере на 88% гомологичен (предпочтительно, по меньшей мере на 77% или по меньшей мере на 88% идентичен) последовательности с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 288, где указанный пептид или его вариант обладает общей длиной, составляющей 8-100, предпочтительно 8-30 и наиболее предпочтительно 8-14 аминокислот.

В последующих таблицах представлены пептиды в соответствии с настоящим изобретением, соответствующие им SEQ ID NO и потенциальные исходные (лежащие в основе) гены для данных пептидов. Все пептиды табл. 1 и 2 связываются с HLA-A*02. Пептиды из табл. 2 были раскрыты ранее в виде обширных списков в качестве результатов скрининга с высокой пропускной способностью с высокой долей ошибок или были вычислены с помощью алгоритмов, однако ранее ни в коей мере не были ассоциированы с раковыми заболеваниями.

Таблица 1. Пептиды в соответствии с настоящим изобретением

SEQ ID No.	Последовательность	Ид. № гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
1	KLQEKIQEL	1062	CENPE
2	SVLEKEIYSI	127602	DNAH14
3	RVIDDSL VGV	2187	FANCB
4	VLFGELPAL	8701	DNAH11
5	GLVDIMVHL	8701	DNAH11
6	FLNAIETAL	8701	DNAH11
7	ALLQALMEL	51236,728071	FAM203A,FAM203B
8	ALSSSQAEV	3833	KIFC1
9	SLITGQDLLSV	51804	SIX4
10	QLIEKNWLL	56992	KIF15
11	LLDPKTIFL	26762	HAVCR1
12	RLLDPKTIFL	26762	HAVCR1
13	RLHDENILL	23322	RPGRIP1L
14	YTFSGDVQL	4312	MMP1
15	GLPSATTTV	94025	MUC16
16	SLADLSLLL	134391	GPR151
17	GLLPSAESIKL	132989	C4orf36
18	KTASINQNV	81930	KIF18A
19	KVFELDLVTL	1063	CENPF
20	ALVEKGEFAL	1063	CENPF
21	YLMDDFSSL	1293	COL6A3
22	LMYPYIYHV	54954	FAM120C
23	ALLSPLSLA	4017,9583	LOXL2,ENTPD4
24	KVWSDVTPL	4320,4322	MMP11,MMP13
25	LLWGHPRVALA	25878	MXRA5
26	VLDGKVAVV	6660	SOX5
27	GLLGKVTSV	51297	BPIFA1
28	IKVTDPLLEL	51297	BPIFA1
29	KMISAIPTL	94025	MUC16
30	IITEVITRL	94025	MUC16
31	GLLETTGLLAT	94025	MUC16
32	VVMVLVLM	94025	MUC16
33	TLDRNSLYV	94025	MUC16
34	TLNTLDINL	94025	MUC16
35	VIIKGLEEI	3832	KIF11
36	TVLQELINV	3832	KIF11
37	QIVELIEKI	3832	KIF11
38	VLQQESNFL	63967	CLSPN
39	YLEDGFAYV	5558	PRIM2
40	KIWEELSVLEV	4102,4105	MAGEA3,MAGEA6
41	IVTEIIEI	64151	NCAPG
42	KQMSISTGL	64151	NCAPG
43	LLIPFTIFM	1237	CCR8

44	AVFNLVHV	56923	NMUR2
45	FLPVSVVYV	56923	NMUR2
46	ISLDEVAVSL	144455	E2F7
47	GLNGFNVLL	144455	E2F7
48	KISDFGLATV	1111	CHEK1
49	KLIGNIHGNEV	8532	CPZ
50	ILLSVLHQL	8532	CPZ
51	LDSEALLTL	84467	FBN3
52	TIGIPFPNV	83990	BRIP1
53	AQHLSTLLL	1469	CST1
54	YLVPGLVAA	64180	DPEP3
55	HLFDKIIKI	654463	FER1L6
56	VLQENSSDYQSNL	3188	HNRNPH2
57	TLYPGRFDYV	338322	NLRP10
58	HLLGEGAFQV	699	BUB1
59	ALADGIKSFL	5296	PIK3R2
60	YLFSQGLQGL	2491	CENPI
61	ALYPKEITL	203102	ADAM32
62	SLVENIHVL	675	BRCA2
63	KLLPMVIQL	246	ALOX15
64	SLYAGSNNQV	246	ALOX15
65	SLSEKSPEV	158511,72846 1	CSAG1,CSAG2
66	AMFPDTIPRV	285220	EPHA6
67	FLIENLLAA	3166	HMX1
68	QLMNLIRSV	51124	IER3IP1
69	LKVLKADVLL	259307	IL4I1
70	GLTEKTVLV	24137,285643	KIF4A,KIF4B
71	HMSGKLTNV	55771	PRR11
72	VLSTRVTNV	55771	PRR11
73	SVPKTLGV	11280	SCN11A
74	GLAFLPASV	6570	SLC18A1
75	ALLDGALQL	6570	SLC18A1
76	FTAEFLEKV	79801	SHCBP1
77	ALYGNVQQV	91646	TDRD12
78	LFQSRIAGV	7579	ZSCAN20
79	TVLEEIGNRV	9133	CCNB2

80	VLTGQVHEL	10715	CERS1
81	ILAEPIYI	55655	NLRP2
82	ILAEPIYIRV	55655	NLRP2
83	GLLENSPHL	25788	RAD54B
84	FLLEREQLL	165055	CCDC138
85	KLLDKPEQFL	342184	FMN1
86	SLFSNIESV	54848	ARHGEF38
87	KLLSLLEEA	54848	ARHGEF38
88	LLLPLELSLA	374946	DRAXIN
89	SLAETIFIV	3359	HTR3A
90	AILNVDEKNQV	3359	HTR3A
91	LLPSIFLMV	3359	HTR3A
92	RLFEEVLGV	9816	URB2
93	RLYGYFHDA	6790	AURKA
94	YLDEVAFML	1238	CCBP2
95	KLIDEDPLFL	1767	DNAH5
96	ALDTTRHEL	93323	HAUS8
97	KLFEKSTGL	23421	ITGB3BP
98	FVQEKIPEL	84944	MAEL
99	TLFGIQLTEA	84944	MAEL
100	ALQSFEFRV	56130	PCDHB6
101	SLLEVNEASSV	149628	PYHIN1
102	GLYPVTLVGV	83696	TRAPPC9
103	YLADTVQKL	100526761,54 937	CCDC169- SOHLH2,SOHLH2
104	DLPTQEPALGTT	354	KLK3
105	AMLASQTEA	4295	MLN
106	VLLGSVVIFA	4477	MSMB
107	RVLPGQAVTGV	55247	NEIL3
108	FIANLPPELKA	6013	RLN1
109	ILGSFELQL	7047	TGM4
110	QIQGQVSEV	7047	TGM4
111	AQLEGKLVSI	3161	HMMR
112	ILAQDVAQL	24137	KIF4A
113	FLFLKEVKV	54596	L1TD1
114	LLFPSDVQTL	23397	NCAPH
115	ILHGEVNKV	54830	NUP62CL

116	ALLSSVAEA	9048	ARTN
117	TLLEGISRA	26256	CABYR
118	IAYNPNGNAL	3824	KLRD1
119	SLIEESEEL	284217	LAMA1
120	LQLJPLKGLSL	6241	RRM2
121	ALYVQAPTV	9319	TRIP13
122	SIIDTELKV	9319	TRIP13
123	QTAPEEAFIKL	150737,92104	TTC30B,TTC30A
124	ALLRLFTI	11169	WDHD1
125	AALVLAEV	11130	ZWINT
126	QLREAFEQL	11130	ZWINT
127	IMKATGLGIQL	154664	ABCA13
128	SILTNISEV	24	ABCA4
129	KMASKVTQV	132612	ADAD1
130	QLYGSAITL	158067	AK8
131	SLYPHFTLL	440138	ALG11
132	ALLNNVIEV	57101	ANO2
133	FLDGRPLTL	83734	ATG10
134	SLYKSFLQL	527	ATP6V0C
135	HLDTVKIEV	135152	B3GAT2
136	LLWDAPAKC	192134	B3GNT6
137	KLIYKDLVSV	85016	C11orf70
138	GIINKLVTV	440087	C12orf69
139	IILENIQSL	55732	C1orf112
140	FLDSQITTV	255119	C4orf22
141	NIDINNREL	57082	CASC5
142	LLDAAHASI	284992	CCDC150
143	MLWESIMRV	166979	CDC20B
144	FLISQTPLL	60437	CDH26
145	ALEEKLENV	79172	CENPO
146	VVAHLAGA	148113	CILP2
147	GLLSALENV	1269	CNR2
148	YLILSSHQL	1269	CNR2
149	NMADGQLHQV	728577,79937	CNTNAP3B,CNTNAP3
150	VLLDMVHSL	100507170,25 5313,653282,7 28036,728042, 728049,72806	CT47A12,CT47A11,CT4 7A7,CT47A10,CT47A9, CT47A8,CT47A6,CT47 A5,CT47A4,CT47A3,CT

		2,728072,728075,728082,728090,728096	47A2,CT47A1
151	DISKRIQSL	100128553,220429,341689,4253,64693	CTAGE4,CTAGE10P,CTAGE16P,CTAGE5,CTAGE1
152	ILVTSIFFL	643	CXCR5
153	KLVELEHTL	203413	CXorf61
154	AIKEIQTV	1588	CYP19A1
155	TLDSYLKAV	163720,199974	CYP4Z2P,CYP4Z1
156	VILTSSPFL	10800	CYSLTR1
157	ILQDGQFLV	138009	DCAF4L2
158	YLDPLWHQL	2072	ERCC4
159	QLGPVPVTI	285966	FAM115C
160	TLQEWLTEV	167555	FAM151B
161	NLLDENVCL	26290	GALNT8
162	GLLGNNLTSL	51608	GET4
163	GLEERLYTA	29933	GPR132
164	MLIIRVPSV	80000	GREB1L
165	SLLDYEVS	116444	GRIN3B
166	LLGDSSFFL	283254	HARBI1
167	LVVDEGSLVSV	92797	HELB
168	VIFEGEPMYL	84072	HORMAD1
169	ALADLSVAV	3363	HTR7
170	FIAAVVEKV	203100	HTRA4
171	LLLLDVPTA	10437	IFI30
172	SLYLQMNSLRTE	28426	IGHV3-43
173	RLIDIYKNV	338567	KCNK18
174	ALYSGDLHAA	157855	KCNU1
175	SLLDLVQSL	57536	KIAA1328
176	VQSGLRILL	57650	KIAA1524
177	ALINVLNAL	146909	KIF18B
178	SLVSWQLLL	3814	KISS1
179	TLGEIIKGV	402569	KPNA7
180	RLYEEEIRI	3887,3889	KRT81,KRT83
181	LLWAPTAQA	389812	LCN15
182	GLQDGFQITV	284194,654346	LGALS9B,LGALS9C

183	ALSYILPYL	147172	LRRC37BP1
184	ALDSTIAHL	149499	LRRC71
185	TLYQGLPAEV	80131	LRRC8E
186	SLLSLESRL	57408	LRTM1
187	SILKEDPFL	346389	MACC1
188	VLGEEQEGV	4108,728269	MAGEA9,MAGEA9B
189	MAVSDLLIL	2862	MLNR
190	SLSTELFKV	4622,4626	MYH4,MYH8
191	AAIEIFEKV	55728	N4BP2
192	TLLPSSGLVTL	344148	NCKAP5
193	ALFHMNILL	126206	NLRP5
194	KLLEEVQLL	126206	NLRP5
195	VIIQNLPAL	387129	NPSR1
196	TLHQWIYYL	120406	NXPE2
197	LGGPTSLLHV	390038	OR51D1
198	ILTNNKVVSV	119678	OR52E2
199	SVADLAHVL	27334	P2RY10
200	IMPTFDLTKV	203569,389860	PAGE2,PAGE2B
201	LLFSLCEA	51050	PI15
202	ALAKDELSL	120379	PIH1D2
203	FLFVDPELV	146850	PIK3R6
204	SEWGSPHAAPV	5539	PPY
205	LAFGYDDEL	391004,654348	PRAMEF17,PRAMEF16
206	GLDAFRIFL	431704	RGS21
207	KLFETVEEL	6121	RPE65
208	HLNNDNRNPL	6406	SEMG1
209	VLQTEELVAN	6406	SEMG1
210	GLAGDNIYL	6582	SLC22A2
211	LLTTVLINA	6582	SLC22A2
212	MTLSEIHAV	9153	SLC28A2
213	ILAVDGVLSV	169026	SLC30A8
214	ALFETLIQL	139420	SMEK3P
215	QIADIVTSV	139420	SMEK3P
216	ALSTVTPRI	166378	SPATA5
217	LLWPSSVPA	246777,79400	SPESP1,NOX5
218	SLTGANITV	83932	SPRTN
219	GVVPTIQKV	64220	STRA6
220	ALSELERVL	51298	THEG
221	IMLNSVEEI	387357	THEMIS
222	LLTGVFAQL	388564	TMEM238
223	ALHPVQFYL	93587	TRMT10A
224	LLFDWSGTGRADA	79465	ULBP3
225	FLPQPVPLSV	57695	USP37
226	SLAGNLQEL	11023	VAX1
227	SEMEELPSV	26609,425054,51481	VCX,VCX3B,VCX3A
228	SLLELDGINLRL	221806	VWDE
229	YLYELEHAL	80217	WDR96
230	KLLNMIFSI	2829	XCR1
231	LLDDIFIRL	143570	XRRA1
232	LVVGGIATV	84614	ZBTB37
233	SLFESLEYL	132625	ZFP42

Таблица 2. Дополнительные пептиды в соответствии с настоящим изобретением

SEQ ID No.	Последовательность	Ид. № гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
234	VLLNEILEQV	64151	NCAPG
235	SLLNQPKAV	63967	CLSPN
236	KMSELQTYV	1063	CENPF
237	ALLEQTGDMSL	1063	CENPF
238	HLQEKQLSL	1063	CENPF
239	VIIKGLLEEITV	3832	KIF11
240	SVQENIQQK	3832	KIF11
241	KQFEGTVEI	675	BRCA2
242	KLQEEIPVL	1062	CENPE
243	GLAEFQENV	57405	SPC25
244	NVAEIVIH	83540	NUF2
245	ALLEEEEGV	4103	MAGEA4
246	ALAGIVTNV	11077	HSF2BP
247	NLLIDDKGTIKL	983	CDK1
248	VLMQDSRLYL	983	CDK1
249	YLYQILQGI	983	CDK1
250	LMQDSRLYL	983	CDK1
251	LLWGNLPEI	653820,729533	FAM72B,FAM72A
252	SLMEKNQSL	24137,285643	KIF4A,KIF4B
253	KLLAVIHEL	25788	RAD54B
254	ALGDKFLLRV	4608	MYBPH
255	FLMKNSDLYGA	79801	SHCBP1
256	FLNDIFERI	337873,337874	HIST2H2BC,HIST2H2BD
257	KLIDHQGLYL	7579	ZSCAN20
258	QLVQRVASV	5683	PSMA2
259	GPGIFPPPPQP	10879	SMR3B
260	ALNESLVEC	55165	CEP55
261	GLAALAVHL	2175	FANCA
262	LLLEAVWHL	2175	FANCA
263	SIIEYLPTL	79915	ATAD5
264	TLHDQVHLL	2099	ESR1
265	FLLDKPQDLSI	346389	MACC1
266	FLLDKPQDL	346389	MACC1
267	YLLDMPLWYL	7153	TOP2A
268	SLDKDIVAL	7153	TOP2A
269	GLLDCPIFL	2177	FANCD2
270	TLLTFFHEL	55215	FANCI
271	VLIEYNFSI	55215	FANCI
272	FVMEGEPPKL	348654	GEN1
273	SLNKQIETV	57650	KIAA1524
274	TLYNPERTITV	10642,10643	IGF2BP1,IGF2BP3
275	AVPPPPSSV	10642	IGF2BP1
276	RMPTVLQCV	9622	KLK4
277	KLQEELNKV	3161	HMMR
278	VLEDKVLVS	128239	IQGAP3
279	VLMDEGAVLTL	54596	L1TD1
280	HLWGHALFL	89866	SEC16B
281	LLLESDPKVYSL	6491	STIL
282	SLYALHVKA	79001	VKORC1
283	ALSELLQQV	9816	URB2
284	KLMDPGSLPPL	2118	ETV4
285	MLLDTVQKV	54892	NCAPG2
286	FLTEMVHFI	93517	SDR42E1
287	KIQEILTQV	10643	IGF2BP3
288	SLYKGLLSV	25788	RAD54B

J = фосфосерин

Особенно предпочтительными являются пептиды - в отдельности или в комбинации - в соответствии с настоящим изобретением, выбранные из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 288. Более предпочтительными являются пептиды - в отдельности или в комбинации - выбранные из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 126 (см. табл. 1) и их применение в иммунотерапии гепатоклеточной карциномы (ГКК), колоректальной карциномы

(КРК), глиобластомы (ГБ), рака желудка (РЖ), рака пищевода, немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), рака поджелудочной железы (РПЖ), почечноклеточной карциномы (ПКК), доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ДГПрЖ), рака предстательной железы (РПрЖ), рака яичника (РЯ), меланомы, рака молочной железы, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), карциномы клеток Меркеля (ККМ), мелкоклеточного рака легких (НМРЛ), неходжкинской лимфомы (НХЛ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), рака желчного пузыря и холангиокарциномы (РЖП, ХК), рака мочевого пузыря (РМП), рака матки (РЭМ).

Наиболее предпочтительными являются пептиды - в отдельности или в комбинации - выбранные из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 274, 14, 21, 23, 25, 157, 168, 11, 253, 85, 89, 40, 264, 155, 233 и 245 (см. табл. 1, 2 и 10) и их применение в иммунотерапии ГКК, КРК, ГБ, РЖ, рака пищевода, НМРЛ, РПЖ, ПКК, ДГПрЖ/РПрЖ, РЯ, ККМ, меланомы, рака молочной железы, РПЛ, НХЛ, ОМЛ, РЖП, ХК, РМП, РЭМ и ХЛЛ.

Настоящее изобретение, более того, относится к пептидам в соответствии с настоящим изобретением, имеющим способность связываться с молекулой главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) I класса или - в удлиненной форме, такой как вариант по длине - МНС II класса.

Настоящее изобретение далее относится к пептидам в соответствии с настоящим изобретением, где указанные пептиды (каждый из них) состоят или состоят, по существу, из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 288.

Настоящее изобретение далее относится к пептидам в соответствии с настоящим изобретением, где указанный пептид модифицирован и(или) включает непептидные связи.

Настоящее изобретение далее относится к пептидам в соответствии с настоящим изобретением, где указанный пептид является частью слитого белка, в частности слитого с N-терминальными аминокислотами HLA-DR антиген-ассоциированной инвариантной цепи (Ii), или слитого с антителом (или встроенный в последовательность), таким как, например, антителом, специфичным для дендритных клеток.

Настоящее изобретение далее относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей пептиды в соответствии с настоящим изобретением. Настоящее изобретение далее относится к нуклеиновой кислоте в соответствии с настоящим изобретением, которая является ДНК, кДНК, ПНК, РНК или их комбинациями.

Настоящее изобретение далее относится к вектору экспрессии, способному к экспрессии и(или) экспрессирующему нуклеиновую кислоту в соответствии с настоящим изобретением.

Настоящее изобретение далее относится к пептиду в соответствии с настоящим изобретением, к нуклеиновой кислоте в соответствии с настоящим изобретением или к вектору экспрессии в соответствии с настоящим изобретением для применения в лечении заболеваний и в медицине, в частности, в лечении рака.

Настоящее изобретение далее относится к антителам, которые являются специфическими по отношению к пептидам в соответствии с настоящим изобретением или комплексам указанных пептидов в соответствии с настоящим изобретением и МНС и способам их получения.

Настоящее изобретение далее относится к Т-клеточным рецепторам (ТКР), в частности, к растворимым ТКР и клонированным ТКР, встроенным в аутологичные или аллогенные Т-клетки, и способам их получения, а также к естественным киллерным клеткам (НК) или другим клеткам, несущим указанный ТКР или вступающим в перекрестную реакцию с указанными ТКР.

Антитела и ТКР являются дополнительными вариантами осуществления иммунотерапевтического применения пептидов в соответствии с настоящим изобретением.

Настоящее изобретение далее относится к клетке-хозяину, включающей нуклеиновую кислоту в соответствии с настоящим изобретением или вектор экспрессии, описанный ранее. Настоящее изобретение далее относится к клетке-хозяину в соответствии с настоящим изобретением, которая является антигенпрезентирующей клеткой, предпочтительно - дендритной клеткой.

Настоящее изобретение далее относится к способу получения пептида в соответствии с настоящим изобретением, причем указанный способ включает культивацию клетки-хозяина в соответствии с настоящим изобретением и выделение пептида из указанной клетки-хозяина или его культуральной среды.

Настоящее изобретение далее относится к указанному способу в соответствии с настоящим изобретением, где антиген нагружен на молекулы МНС I или II класса, экспрессированные на поверхности подходящей антигенпрезентирующей клетки или искусственной антигенпрезентирующей клетки, при контактировании достаточного количества антигена с антигенпрезентирующей клеткой.

Настоящее изобретение далее относится к способу в соответствии с настоящим изобретением, где антигенпрезентирующая клетка включает вектор экспрессии, способный экспрессировать указанный пептид, содержащий последовательность с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 288, предпочтительно содержащий последовательность с SEQ ID No: 1 по SEQ ID No: 126 или его вариантную аминокислотную последовательность.

Настоящее изобретение далее относится к активированным Т-клеткам, полученным способом в соответствии с настоящим изобретением, где указанная Т-клетка селективно распознает клетку, которая экспрессирует полипептид, включающий аминокислотную последовательность в соответствии с настоящим изобретением.

Настоящее изобретение далее относится к способу уничтожения клеток-мишеней у пациента, чьи клетки-мишени aberrантно экспрессируют полипептид, включающий любую аминокислотную последовательность в соответствии с настоящим изобретением, причем способ включает введение пациенту эффективного числа Т-клеток, полученных в соответствии с настоящим изобретением.

Настоящее изобретение далее относится к применению любого описанного пептида, нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, вектора экспрессии в соответствии с настоящим изобретением, клетки в соответствии с настоящим изобретением, активированного Т-лимфоцита, Т-клеточного рецептора или антитела или других молекул, связывающихся с пептидом и(или) комплексом пептид-МНС в соответствии с настоящим изобретением в качестве медикамента или в производстве медикамента. Предпочтительно, если указанный медикамент обладает активным противораковым действием.

Предпочтительно, если указанный медикамент подходит и применяется для клеточной терапии, является вакциной или белком на основе растворимого ТКР или антителом.

Настоящее изобретение далее относится к применению в соответствии с настоящим изобретением, где указанные раковые клетки являются клетками ГМК, КРК, ГБ, РЖ, рака пищевода, НМРЛ, РПЖ, ПКК, ДГПрЖ/РПрЖ, РЯ, ККМ, меланомы, рака молочной железы, МРЛ, НХЛ, ОМЛ, РЖП, ХК, РМП, РЭМ или ХЛЛ.

Настоящее изобретение далее относится к биомаркерам на основе пептидов в соответствии с настоящим изобретением, называемым в контексте настоящего описания "мишени", которые могут быть использованы для диагностики рак, предпочтительно ГМК, КРК, ГБ, РЖ, рака пищевода, НМРЛ, РПЖ, ПКК, ДГПрЖ/РПрЖ, РЯ, ККМ, меланомы, рака молочной железы, МРЛ, НХЛ, ОМЛ, РЖП, ХК, РМП, РЭМ и ХЛЛ. В роли маркера может выступать как избыточная презентация самого(их) пептида(ов), так и избыточная экспрессия соответствующего(их) гена(ов). Эти маркеры могут также использоваться для предсказания вероятности успеха лечения, предпочтительно иммунотерапии, и, наиболее предпочтительно, иммунотерапии, направленной на ту же мишень, которая была идентифицирована биомаркером. Например, для окрашивания срезов опухоли для выявления присутствия интересующего пептида в комплексе с МНС может использоваться антитело или растворимый ТКР.

Факультативно антитело обладает дополнительной эффекторной функцией, например, несет иммуностимулирующий домен или токсин.

Настоящее изобретение относится также к применению этих новых мишеней в контексте лечения рака.

СABYR кодирует белок, локализованный в основной части жгутика сперматозоида в ассоциации с фиброзной оболочкой и обладает свойством связывания с кальцием, если он фосфорилирован во время процесса капацитации (RefSeq, 2002). Нокаунт изоформ СABYR, СABYR-а и СABYR-б, в линиях клеток немелкоклеточного рака легких NCI-H460 и A549, как было продемонстрировано, приводит к ингибированию пролиферации и ослаблению фосфорилирования конститутивно активной формы Akt (Qian et al., 2014). Сайленсинг экспрессии СABYR, как было показано, влияет на последующие компоненты сигнальных путей Akt, такие как фосфо-GSK-3-бета и белки p53 и p27 (Qian et al., 2014). Кроме того, нокаунт СABYR, как было показано, существенно повышает чувствительность к химиотерапевтическим препаратам в ответ на их воздействие и вызванный лекарственными средствами апоптоз, как *in vitro*, так и *in vivo*, и может, таким образом, быть новым методом по улучшению апоптотического ответа и чувствительности к химиотерапевтическим препаратам (Qian et al., 2014). СABYR описывали первоначально как специфический для семенника белок, который, как было показано впоследствии, представлен в опухолях головного мозга, клетках рака поджелудочной железы и легких (Hsu et al., 2005; Luo et al., 2007; Li et al., 2012). Уровень СABYR, как было показано, повышен в клетках гепатоклеточной карциномы и может играть онкогенную роль в гепатоканцерогенезе, а также в его прогрессировании (Li et al., 2012).

COL6A3 кодирует коллаген, тип VI, альфа 3, одну из трех альфа-цепей коллагена VI типа, коллагена, формирующего филаменты-бусины, представленного в большинстве соединительных тканей, и важного в организации компонентов матрикса (RefSeq, 2002). COL6A3 кодирует цепь альфа-3 коллагена VI типа, коллагена, формирующего филаменты-бусины, представленного в большинстве соединительных тканей и играющего важную роль в организации компонентов матрикса (RefSeq, 2002). COL6A3 экспрессируется вследствие альтернативного сплайсинга при раке толстой кишки, мочевого пузыря и предстательной железы. Длинная изоформа COL6A3 экспрессируется практически исключительно в раковых образцах и могла бы потенциально служить в качестве нового маркера рака (Thorsen et al., 2008). COL6A3 экспрессируется в высокой степени в тканях протоковой аденокарциномы поджелудочной железы и подвергается опухолеспецифическому альтернативному сплайсингу (Kang et al., 2014). COL6A3, как было продемонстрировано, коррелирует с раком яичника высокой степени злокачественности и способствует развитию устойчивости к цисплатину. Наблюдалось, что COL6A3 часто экспрессируется в избытке в тканях рака желудка (Xie et al., 2014). Мутация(и) COL6A3 значимо предсказывала(и) лучшую общую выживаемость у пациентов с колоректальными карциномами вне зависимости от дифференциации опухоли и стадии по системе TNM (Yu et al., 2015). Уровень экспрессии COL6A3, как сообщалось, повышен при раке поджелудочной железы, раке толстой кишки, раке желудка, слизеобразующем плос-

клеточном раке и раке яичника. Варианты транскриптов, ассоциированные с раком, включая экзоны 3, 4 и 6, были обнаружены в клетках рака толстой кишки, рака мочевого пузыря, предстательной железы и рака поджелудочной железы (Arafat et al., 2011; Smith et al., 2009; Yang et al., 2007; Xie et al., 2014; Leivo et al., 2005; Sherman-Baust et al., 2003; Gardina et al., 2006; Thorsen et al., 2008). При раке яичника уровни COL6A3 коррелировали с более высокой степенью злокачественности, а при раке поджелудочной железы, как было продемонстрировано, COL6A3 представлял собой подходящий диагностический биомаркер сыворотки (Sherman-Baust et al., 2003; Kang et al., 2014).

CXorf61, также известный как CT83, кодирует раково-тестикулярный антиген 83 и локализован на хромосоме Xq23 (RefSeq, 2002). Экспрессию CXorf61 описывали в разных видах раковых опухолей, включая рак молочной железы и рак легких (Yao et al., 2014; Hanagiri et al., 2013; Baba et al., 2013). CXorf61, как было показано, является иммуногенным раково-тестикулярным антигеном при раке легких. Поэтому он мог бы стать многообещающим кандидатом для противораковой иммунотерапии (Fukuyama et al., 2006).

CYP4Z1 кодирует члена надсемейства ферментов цитохромов P450. Белки цитохромы P450 являются монооксигеназами, которые катализируют множество реакций, участвующих в метаболизме лекарственных средств и синтезе холестерина, стероидов и других липидов (RefSeq, 2002). Избыточная экспрессия CYP4Z1 при раке молочной железы ассоциируется с высокой степенью злокачественности и неутешительным прогнозом. С точки зрения функциональных свойств CYP4Z1 способствует ангиогенезу и росту опухоли при раке молочной железы отчасти за счет сигнальных путей PI3/Akt и ERK1/2 (Yu et al., 2012; Murray et al., 2010). Более того, было описано, что CYP4Z1 играет роль в прогрессировании немелкоклеточного рака легких (Bankovic et al., 2010). В клетках рака предстательной железы и рака яичника CYP4Z1 был идентифицирован в качестве независимого предсказательного маркера (Tradonsky et al., 2012; Downie et al., 2005). CYP4Z2P является псевдогеном, локализованным на хромосоме 1p33 (RefSeq, 2002).

Ген DCAF4L2 кодирует DDB1 и CUL4-ассоциированный фактор 4-подобный 2. Конкретная функция данного белка должна быть выяснена более точно; тем не менее ген DCAF4L2, как было показано, ассоциирован с морфологией диска зрительного нерва и развитием незаращения верхней губы (Springelkamp et al., 2015; Beaty et al., 2013).

ESR1 кодирует рецептор эстрогена, активируемый лигандом фактор транскрипции, важный для связывания гормонов, связывания ДНК и активации транскрипции, что необходимо для полового развития и репродуктивной функции (RefSeq, 2002). Мутации и однонуклеотидные полиморфизмы гена ESR1 ассоциируются с риском заболевания различными видами рака, включая рак печени, предстательной железы, мочевого пузыря и молочной железы. Повышенный уровень экспрессии ESR1 связан с клеточной пролиферацией и ростом опухоли, однако общая выживаемость у пациентов с ESR1-положительными опухолями лучше в связи с успешной терапией селективными модуляторами рецептора эстрогена (Sun et al., 2015; Hayashi et al., 2003; Bogush et al., 2009; Miyoshi et al., 2010; Xu et al., 2011; Yakimchuk et al., 2013; Fuqua et al., 2014). Сигнальные пути ESR1 интерферируют с различными путями, ответственными за трансформацию, рост и выживаемость клеток, таких как пути EGFR/IGFR, PI3K/Akt/mTOR, p53, HER2, NFκB и TGF-β (Frasor et al., 2015; Band and Laiho, 2011; Berger et al., 2013; Skandalis et al., 2014; Mehta and Tripathy, 2014; Ciruelos Gil, 2014).

FMN1 кодирует формин-1, белок, играющий роль в формировании адгезионных контактов и полимеризации линейных жгутов актина (RefSeq, 2002). Однонуклеотидный полиморфизм гена FMN1 ассоциируется с повышенным риском заболевания раком предстательной железы (Lisitskaia et al., 2010).

HAVCR1, известный также как клеточный рецептор 1 вируса гепатита А или KIM-1, кодирует мембранный белок-рецептор как для вируса гепатита А человека, так и для TIMD4, и может быть задействован в сдерживании проявлений астмы и аллергических заболеваний (RefSeq, 2002). HAVCR1 был описан в качестве кандидата в новые биомаркеры, ассоциированного со светлоклеточной карциномой яичника и почечноклеточной карциномой (Bonventre, 2014; Kobayashi et al., 2015). HAVCR1, как было показано, активирует ось IL-6/STAT-3/HIF-1A в клеточных линиях светлоклеточной почечноклеточной карциномы и определяет прогрессирование опухоли и исход для пациента (Cuadros et al., 2014). Конститутивную экспрессию HAVCR1 в почках описывали в качестве потенциального признака предрасположенности к развитию светлоклеточной почечноклеточной карциномы (Cuadros et al., 2013). Кроме того, как было показано, усиленное слушивание эктодомена HAVCR1 способствует развитию инвазивного фенотипа *in vitro* и более агрессивных опухолей *in vivo* (Cuadros et al., 2013). Повышение уровня HAVCR1 было описано для почечноклеточных карцином и светлоклеточных карцином яичника и колоректальной карциномы (Wang et al., 2013b). Повышенный уровень HAVCR1 был описан в качестве потенциального диагностического биомаркера для колоректального рака и прогностического маркера для более долгого срока выживаемости без признаков заболевания после хирургической операции, который может быть также задействован в метастатическом каскаде при колоректальном раке (Wang et al., 2013b). Как было показано, HAVCR1 ассоциируется с Т-клеточным лейкозом из больших гранулярных лимфоцитов (Wlodarski et al., 2008).

HORMAD1 (известный также как CT46) кодирует белок, содержащий домен NORMA, который мо-

жет играть роль в мейозе. Домены NORMA задействованы в связывании хроматина и регулировании клеточного цикла (RefSeq, 2002). NORMAD1 является раково-тестикулярным антигеном, избыточно экспрессируемым при различных видах рака, включая рак молочной железы, желудка и яичника, и таким образом, он является потенциальным биомаркером и мишенью иммунотерапии (Yao et al., 2014; Shahzad et al., 2013; Chen et al., 2005; Aung et al., 2006; Adelaide et al., 2007). Снижение уровня NORMAD1 ведет к снижению инвазии, миграции и веса опухоли и снижению уровня белка VEGF (фактор роста эндотелия сосудов) (Shahzad et al., 2013).

HSF2BP кодирует HSF2-связывающий белок, который ассоциируется с HSF2, и может быть задействован в модулировании активации HSF2 (RefSeq, 2002).

HSF4 кодирует транскрипционный фактор теплового шока 4, который активирует гены реакции на тепловой шок в условиях теплового или иного стресса (RefSeq, 2002). Уровень HSF4, как было продемонстрировано, понижен при глиобластоме (Mustafa et al., 2010).

HTR3A кодирует рецептор 5-гидрокситриптамина (серотонина), относящийся к суперсемейству рецепторов лигандуправляемых ионных каналов, которые приводят к быстрым, деполяризующим ответам в нейронах после активации (RefSeq, 2002). Регуляция уровня HTR3A (известного также как 5-HT3) нарушена при нескольких видах рака, например, понижение уровня наблюдается при лимфомах из клеток мантийной зоны, дифференцированная экспрессия - при различных В-клеточных опухолях и пониженный уровень экспрессии - в клеточных линиях рака молочной железы (Pai et al., 2009; Rinaldi et al., 2010; Ek et al., 2002).

IGF2BP1, также известный как CRD-BP, кодирует члена семейства белков, связывающих мРНК инсулиноподобных факторов роста 2, который задействован при связывании с мРНК конкретных генов и регулировании их трансляции (RefSeq, 2002). Два члена семейства белков, связывающих мРНК IGF2, включая IGF2BP1, были описаны в качестве полноценных онкофетальных белков, которые синтезируются *de novo* в различных видах рака человека, и которые могут быть мощными пост-транскрипционными онкогенами, усиливающими рост опухоли, лекарственную резистентность и метастазирование (Lederer et al., 2014). О экспрессии IGF2BP1 сообщалось, что она коррелирует с общим неблагоприятным прогнозом и метастазированием при различных видах рака человека (Lederer et al., 2014). Таким образом, предполагается, что IGF2BP1 является эффективным биомаркером и кандидатом в качестве мишени противораковой терапии (Lederer et al., 2014). Для членов семейства IGF2BP была описана высокая степень ассоциации с метастазами при раке и экспрессией онкогенных факторов, таких как KRAS, MYC и MDR1 (Bell et al., 2013). Было показано, что IGF2BP1 взаимодействует с C-MYC и, как было обнаружено, экспрессируется в подавляющем большинстве опухолей толстой кишки и молочной железы и сарком, а также в доброкачественных опухолях, таких как фиброаденома молочной железы и минингиома (Ioannidis et al., 2003). Уровень IGF2BP1, как было продемонстрировано, повышен при гепатоклеточной карциноме и базальноклеточной карциноме (Noubissi et al., 2014; Zhang et al., 2015a). Повышенный уровень IGF2BP1 и других генов, как было показано, значимо ассоциируется с неутешительным прогнозом на период после операции при гепатоклеточной карциноме (Zhang et al., 2015a). Как было продемонстрировано, IGF2BP1 является мишенью супрессоров опухоли miR-9 и miR-372 при гепатоклеточной карциноме и почечноклеточной карциноме соответственно (Huang et al., 2015; Zhang et al., 2015a). Потеря стромального IGF2BP1, как было показано, способствует развитию онкогенного микроокружения в толстой кишке, указывая на то, что IGF2BP1 играет роль опухолевого супрессора в стромальных клетках толстой кишки (Hamilton et al., 2015). IGF2BP1, как было показано, ассоциируется с опухолями 4-ой стадии, понижением выживаемости пациентов и амплификацией гена MYCN при нейробластоме и может, таким образом, быть потенциальным онкогеном и независимым негативным прогностическим фактором при нейробластоме (Bell et al., 2015). IGF2BP1 описывали в качестве прямой мишени сигнального пути WNT/ β -катенина, который регулирует экспрессию GLI1 и активность при развитии базальноклеточной карциномы (Noubissi et al., 2014).

IGF2BP3 кодирует инсулиноподобный фактор роста II мРНК-связывающий белок 3, онкофетальный белок, который подавляет трансляцию инсулиноподобного фактора роста II (RefSeq, 2002). Несколько исследований показали, что IGF2BP3 участвует в различных важных аспектах клеточных функций, таких как клеточная поляризация, миграция, морфология, метаболизм, пролиферация и дифференциация. Исследования *in vitro* показали, что IGF2BP3 способствует пролиферации, адгезии и инвазии опухолевых клеток. Кроме того, было продемонстрировано, что IGF2BP3 ассоциируется с агрессивными видами рака и поздними стадиями (Bell et al., 2013; Gong et al., 2014). Избыточную экспрессию IGF2BP3 описывали при многочисленных видах раковых опухолей, и она коррелировала с неблагоприятным прогнозом, поздней стадией опухолей и метастазами, как, например, при нейробластоме, колоректальной карциноме, внутривенной холангиокарциноме, гепатоклеточной карциноме, раке предстательной железы и почечноклеточной карциноме (Bell et al., 2013; Findeis-Hosey and Xu, 2012; Hu et al., 2014; Szarvas et al., 2014; Jeng et al., 2009; Chen et al., 2011; Chen et al., 2013; Hoffmann et al., 2008; Lin et al., 2013; Yuan et al., 2009).

MAGEA3 кодирует белок семейства меланома-ассоциированных антигенов A3. MAGEA3 широко известен как раково-тестикулярный антиген (RefSeq, 2002; Pineda et al., 2015; De et al., 1994). Долгое

время о MAGEA3 было известно, что он используется в клинических исследованиях по терапевтической вакцинации при метастатической меланоме. Проводимая сейчас чрескожная иммунизация пептидами MAGEA3 и 4 другими антигенами пациентов с распространенной злокачественной меланомой, как было показано, способствует существенно более длительной общей выживаемости у пациентов с полными ответами в сравнении с пациентами с неполными ответами (Coulie et al., 2002; Fujiyama et al., 2014). Как было показано, MAGEA3 был часто экспрессирован при НМРЛ. Экспрессия MAGEA3 коррелировала с более высоким числом некрозов опухоли в образцах ткани НМРЛ и, как было показано, ингибировала пролиферацию и инвазию и способствовала апоптозу в клеточных линиях рака легких. У пациентов с аденокарциномами экспрессия MAGEA3 ассоциировалась с лучшей выживаемостью. В настоящее время проходят исследования вакцины на основе цельных клеток, направленной на MAGEA3, в рамках многообещающего клинического исследования III фазы по лечению НМРЛ (Perez et al., 2011; Reck, 2012; Hall et al., 2013; Grah et al., 2014; Liu et al., 2015). MAGEA3 вместе с 4 другими генами, как было показано, часто экспрессировался в клетках ГКК. Экспрессия этих генов у пациентов с ГКК коррелировала с числом циркулирующих опухолевых клеток, высокой степенью злокачественности опухоли и поздними стадиями опухоли. Частота метастазов в печень, как было показано, существенно выше в случае образцов опухоли, которые экспрессировали MAGE3, чем в образцах, которые не экспрессировали этот ген (Bhannassy et al., 2014; Hasegawa et al., 1998). Побочные популяции клеток, подобных стволовым раковым клеткам, выделенные из клеточной линии рака мочевого пузыря, а также из клеточных линий рака легких, толстой кишки или молочной железы экспрессировали MAGEA3 помимо прочих раково-тестикулярных антигенов. В целом, о раковых стволовых клетках известно, что они обладают устойчивостью к используемым в настоящее время способам лечения рака и вызывают развитие рецидивов и прогрессирование рака после проведения лечения. Таким образом, MAGEA3 может служить в качестве новой мишени для иммунотерапевтического метода лечения, в частности, рака мочевого пузыря (Yamada et al., 2013; Yin et al., 2014). В клетках плоскоклеточной карциномы головы и шеи экспрессия MAGEA3, как было показано, ассоциируется с лучшей выживаемостью без признаков заболевания (Zamuner et al., 2015). Кроме того, MAGEA3 может применяться в качестве прогностического маркера для рака яичника (Szajnik et al., 2013).

MAGEA4, также известный как MAGE4, кодирует члена семейства генов MAGEA и локализован на хромосоме Xq28 (RefSeq, 2002). MAGEA4 был описан в качестве раково-тестикулярного антигена, который, как было обнаружено, экспрессируется в небольшой доле классических семином, но не в несеминозных опухолях мужских половых клеток, при карциноме молочной железы, EBV (Вирус Эпштейна-Барра)-негативных случаях лимфомы Ходжкина, карциноме пищевода, карциноме легких, карциноме мочевого пузыря, карциноме головы и шеи и колоректальном раке, плоскоклеточной карциноме полости рта и гепатоклеточной карциноме (Ries et al., 2005; Bode et al., 2014; Li et al., 2005; Ottaviani et al., 2006; Hennard et al., 2006; Chen et al., 2003). Было продемонстрировано, что MAGEA4 часто экспрессируется в первичных меланомх слизистой оболочки головы и шеи и, таким образом, может быть потенциальной мишенью иммунотерапии, основанной на раково-тестикулярном антигене (Prasad et al., 2004). MAGEA4, как было показано, преимущественно экспрессируется в опухолевых клетках, подобных стволовым, полученных из клеток линий LHK2 аденокарциномы легких, SW480 аденокарциномы толстой кишки и MCF7 аденокарциномы молочной железы (Yamada et al., 2013). Избыточная экспрессия MAGEA4 в спонтанно трансформированных нормальных кератиноцитах ротовой полости, как было продемонстрировано, способствуют росту, препятствуя блокировке клеточного цикла и ингибируя апоптоз, опосредуемый транскрипционными генами-мишенями p53, BAX и CDKN1A (Bhan et al., 2012). MAGEA4, как было показано, чаще экспрессируется у пациентов, инфицированных вирусом гепатита С, с циррозом печени и гепатоклеточной карциномой поздних стадий в сравнении с пациентами с гепатоклеточной карциномой ранних стадий, таким образом, делая выявление транскриптов MAGEA4 потенциально полезным для составления прогноза (Hussein et al., 2012). Было показано, что MAGEA4 является одним из раково-тестикулярных антигенов, которые экспрессируются в клетках рака легких и которые могут выступать в роли потенциальных кандидатов для поливалентной иммунотерапии пациентов с раком легких (Kim et al., 2012). Было описано, что уровень MAGEA4 повышен при карциноме пищевода и гепатоклеточной карциноме (Zhao et al., 2002; Wu et al., 2011). Образованный из MAGEA4 аналог нативного пептида, именуемый p286-1Y2L9L, описывали в качестве нового эпитопа-кандидата, подходящего для разработки пептидных вакцин против рака пищевода (Wu et al., 2011). Несколько членов семейства генов MAGE, включая MAGEA4, как было продемонстрировано, часто имеют мутации при меланоме (Caballero et al., 2010).

MAGEA6 кодирует белок A6 семейства меланома-ассоциированных антигенов. MAGEA3 широко известен как раково-тестикулярный антиген (RefSeq, 2002; Pineda et al., 2015; De et al., 1994). Как было показано, MAGEA6 часто экспрессируется при меланоме, распространенной миеломе, детской рабдомиосаркоме, саркоме, раке легких, мочевого пузыря, предстательной железы, молочной железы и колоректальном раке, плоскоклеточных карциномах головы и шеи, пищевода и ротовой полости (Ries et al., 2005; Hasegawa et al., 1998; Gibbs et al., 2000; Dalerba et al., 2001; Otte et al., 2001; van der Bruggen et al., 2002; Lin et al., 2004; Tanaka et al., 1997). Экспрессия MAGEA6 ассоциировалась с более коротким сро-

ком выживаемости без прогрессирования у пациентов с множественной миеломой. Напротив, при плоскоклеточной карциноме головы и шеи экспрессия MAGEA6, как было продемонстрировано, ассоциировалась с лучшей выживаемостью без признаков заболевания (Van et al., 2011; Zamuner et al., 2015). MAGEA6 был в составе набора генов, избыточно экспрессируемых в клеточной линии рака яичника, устойчивого к паклитакселу. Более того, трансфекция MAGEA6 также вызывала повышение лекарственной резистентности чувствительных к паклитакселу клеток (Duan et al., 2003). MAGEA6 может использоваться в качестве прогностического маркера рака яичника (Szajnik et al., 2013). Побочные популяции клеток, подобных стволовым раковым клеткам, выделенные из клеточных линий рака легких, толстой кишки или молочной железы, демонстрировали экспрессию MAGEA6 помимо других раково-тестикулярных антигенов (Yamada et al., 2013).

MAGEA9, известный также как MAGE9 или MAGE-A9, кодирует члена семейства генов MAGEA и локализован на хромосоме Xq28 (RefSeq, 2002). Высокий уровень экспрессии MAGEA9 в опухолевых и стромальных клетках немелкоклеточного рака легких, как было показано, коррелирует с плохой выживаемостью (Zhang et al., 2015b). Экспрессию MAGEA9 описывали в качестве независимого прогностического фактора для оценки пятилетней общей выживаемости при немелкоклеточном раке легких (Zhang et al., 2015b). Присутствие MAGEA9 у больных с недавно диагностированной множественной миеломой, как было показано, ассоциируется с более короткой общей выживаемостью (Van et al., 2011). MAGEA9 описывали в качестве антигена почечноклеточной карциномы, введение которого при вакцинации дендритными клетками мышей линии BALB/c, как было показано, приводит к отторжению трансплантата почечноклеточной карциномы низкой дозы RENCA-MAGEA9 (Herbert et al., 2010). Линии MAGEA9 пептид-специфических цитотоксических Т-лимфоцитов, как было показано, проявляют высокую цитотоксическую активность по отношению к нагруженным пептидом клеткам T2 и клеточным линиям почечноклеточной карциномы, естественно экспрессирующим MAGEA9, что делает MAGEA9 потенциально подходящей мишенью иммунотерапии почечноклеточной карциномы (Oehlrich et al., 2005). Как было показано, MAGEA9 является одним из наиболее часто экспрессируемых раково-тестикулярных антигенов при раковых опухолях матки (Risinger et al., 2007). MAGEA9 описывали как члена семейства антигенов MAGE, который экспрессируется при раке яичка (Zhan et al., 2015). Высокая экспрессия MAGEA9, как было показано, ассоциируется с инвазией вен и метастазами в лимфатические узлы при колоректальном раке (Zhan et al., 2015). Экспрессия MAGEA9, как было продемонстрировано, ассоциируется с более низким уровнем выживаемости при колоректальном раке, и высокий уровень экспрессии MAGEA9 описывался как неблагоприятный прогностический фактор для пациентов с колоректальным раком (Zhan et al., 2015). Таким образом, ожидается, что MAGEA9 станет новой мишенью при лечении колоректального рака (Zhan et al., 2015). Избыточная экспрессия MAGEA9, как было показано, является индикатором неблагоприятного прогноза при эпителиальном раке яичника, инвазивном протоковом раке молочной железы, плоскоклеточной карциноме гортани и гепатоклеточной карциноме (Gu et al., 2014; Han et al., 2014; Xu et al., 2014; Xu et al., 2015). Как было показано, уровень MAGEA9 при плоскоклеточной карциноме гортани, инвазивном протоковом раке молочной железы, эпителиальном раке яичника, колоректальном раке и гепатоклеточной карциноме (Gu et al., 2014; Han et al., 2014; Xu et al., 2014; Xu et al., 2015; Zhan et al., 2015).

MAGEA9B кодирует дубликацию белка MAGEA9 на хромосоме X (RefSeq, 2002). Экспрессия MAGEA9B на стадии опухоли Ib немелкоклеточного рака легких коррелирует с выживаемостью пациента (Urgard et al., 2011).

MMP1 кодирует члена семейства пептидаз M10 матричных металлопротеиназ (MMP). Белки этого семейства задействованы в разрушении внеклеточного матрикса при нормальных физиологических процессах, таких как эмбриональное развитие, размножение и ремоделирование тканей в равной степени, как и во время заболеваний, таких как артрит и метастазы (RefSeq, 2002). Многие авторы показали положительную корреляцию между паттернами экспрессии MMP и инвазивным и метастатическим потенциалами опухоли, включая: рак прямой кишки и желудка, карциному легких, опухоли молочной железы, яичника, предстательной железы, щитовидной железы и головного мозга (Velinov et al., 2010). MMP1 был идентифицирован в качестве биомаркера с зависимой от стадии опухоли экспрессией при плоскоклеточной карциноме гортани (Hui et al., 2015). Пациенты с раком молочной железы с циркулирующими опухолевыми клетками с эпителиально-мезенхимальным переходом (CTC_EMT) в периферической крови имели значимо повышенный уровень экспрессии MMP1 в опухолевых клетках ($p = 0,02$) и ассоциированной с опухолью строме ($p = 0,05$), чем у пациентов без CTC_EMT (Cierna et al., 2014). В мышиной модели экспрессия и секреция MMP1 блокировалась специфическими моноклональными антителами к FGFR3, что существенно блокировало прогрессирование опухоли (Du et al., 2014).

Белки семейства матричной металлопротеиназы (MMP) задействованы в разрушении внеклеточного матрикса при нормальных физиологических процессах, таких как эмбриональное развитие, размножение и ремоделирование тканей в равной степени, как и во время заболеваний, таких как артрит и метастазы. Тем не менее, фермент, кодируемый этим геном, активируется внутриклеточно фурином по конститутивному секреторному механизму. Также в отличие от других MMP данный фермент расщепляет ингибитор альфа 1-протеиназы, но слабо расщепляет структурные белки внеклеточного матрикса (Ref-

Seq, 2002). MMP-11, называемый также стромелизин-3, является членом подгруппы стромелизинов, относящейся к надсемейству MMP, который был обнаружен в раковых клетках, клетках стромы и границах микроокружения. MMP-11 оказывает двойное воздействие на опухоли. С одной стороны, MMP-11 способствует развитию рака, ингибируя апоптоз в равной степени как и усиливая миграцию и инвазию раковых клеток; с другой стороны, MMP-11 играет негативную роль в развитии раковых опухолей за счет подавления метастазов в моделях с животными. Избыточная экспрессия MMP-11 была обнаружена в сыворотке пациентов, больных раком, по сравнению с нормальной контрольной группой, а также во многих препаратах опухолевой ткани, таких как ткань рака желудка, молочной железы и поджелудочной железы (Zhang et al., 2016). MMP-11, как было продемонстрировано, избыточно экспрессируется на уровне мРНК и уровне белка в ткани КРК, а не в соответствующих образцах нормальной слизистой оболочки. Более того, экспрессия MMP-11 коррелировала с метастазами в лимфатические узлы при КРК; отдаленными метастазами и стадией по TNM (Tian et al., 2015). Избыточная экспрессия MMP-11 ассоциируется с агрессивным опухолевым фенотипом и неблагоприятным клиническим исходом при уротелиальных карциномах верхних мочевых путей (UTUC) уротелиальных карциномах мочевого пузыря (UBUC), позволяя предположить, что она может служить в качестве новой прогностической и терапевтической мишени (Li et al., 2016).

MXRA5 кодирует один из белков, ассоциированных с ремоделированием матрикса, который содержит 7 обогащенных лейцином повторов и 12 иммуноглобулин-подобных домена типа C2, связанных с перлеканом (RefSeq, 2002). Китайское клиническое исследование идентифицировало MXRA5 в качестве второго наиболее часто подвергающегося мутации гена при немелкоклеточном раке легких (Xiong et al., 2012). Как было показано, MXRA5 избыточно экспрессируется при раке толстой кишки и мог бы служить в качестве биомаркера для постановки диагноза на ранних стадиях и метастазов в сальнике (Zou et al., 2002; Wang et al., 2013a).

RAD54 кодирует белок, относящийся к надсемейству DEAD-подобных геликаз. Он имеет сходство с RAD54 и RDH54 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, которые оба задействованы в гомологичной рекомбинации и репарации ДНК. Связываясь с двухнитевой ДНК, этот белок проявляет АТФазную активность в присутствии ДНК. Этот ген экспрессируется в высокой степени в семеннике и селезенке, что позволяет предположить активное участие в мейотической и митотической рекомбинации (RefSeq, 2002). Гомозиготные мутации RAD54B наблюдались в первичных лимфомах и раковых опухолях толстой кишки (Hiramoto et al., 1999). RAD54B препятствует воздействию от прямого связывания RAD51 с дцДНК, дестабилизирующему геном, в опухолевых клетках человека (Mason et al., 2015).

ZFP42 (известный также как REX1) кодирует белок с доменом "zinc finger", используемый в качестве маркера стволовых клеток и необходимый для плюрипотентности и репрограммирования (Son et al., 2013; Mongan et al., 2006). Уровень экспрессии ZFP42 снижен в клетках предстательной железы и почечноклеточной карциномы, однако он повышен при плоскоклеточной карциноме (Raman et al., 2006; Lee et al., 2010; Reinisch et al., 2011). ZFP42 ингибирует сигнальный путь JAK/STAT за счет регуляции экспрессии SOCS3, которая моделирует дифференциацию клеток (Xu et al., 2008).

Стимуляция иммунных ответов зависит от присутствия антигенов, распознаваемых иммунной системой хозяина как чужеродные. Открытие существования опухолеассоциированных антигенов повысило возможность использования иммунной системы хозяина для вмешательства в рост опухоли. Различные механизмы управления обеими ветвями иммунной системы, как гуморальной, так и клеточной, исследуются в настоящее время для иммунотерапии рака.

Специфические элементы клеточных иммунных ответов способны к специфическому распознаванию и уничтожению опухолевых клеток. Выделение Т-клеток из популяций опухоль-инфильтрирующих клеток или из периферической крови предполагает, что такие клетки играют важную роль в естественной иммунной защите против рака. В частности, CD8-положительные Т-клетки, которые распознают пептиды, связанные с молекулами I класса главного комплекса гистосовместимости (МНС), играют важную роль в этом ответе. Эти пептиды обычно состоят из 8-10 аминокислотных остатков, полученных из белков или дефектных рибосомных продуктов (DRIP), находящихся в цитозоле. Молекулы МНС человека называются также человеческими лейкоцитарными антигенами (HLA).

Понятие "Т-клеточный ответ" означает специфическую пролиферацию и активацию эффекторных функций, индуцированных пептидом *in vitro* или *in vivo*. Для цитотоксических Т-клеток, рестриктированных по МНС I класса, эффекторными функциями может быть лизис клеток-мишеней, нагруженных пептидом, нагруженных предшественником пептида, или клеток-мишеней, естественно презентующих пептид; секреция цитокинов, предпочтительно интерферона-гамма, TNF-альфа или ИЛ-2, индуцированная пептидом; секреция эффекторных молекул, предпочтительно гранзимов или перфоринов, индуцированная пептидом, или дегрануляция.

Понятие "пептид" в контексте настоящего описания обозначает серии аминокислотных остатков, связанных друг с другом обычно пептидными связями между альфа-аминными и карбонильными группами смежных аминокислот. Пептиды предпочтительно имеют длину в 9 аминокислот, но могут быть короче - 8 аминокислот в длину, и длиннее - 10, 11, 12 или 13 аминокислот или длиннее и в случае пептидов, связанных с молекулами МНС II класса (удлиненные варианты пептидов по изобретению), они

могут иметь длину в 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 или более аминокислот.

Кроме того, понятие "пептид" включает в себя соли серии аминокислотных остатков, связанных друг с другом обычно пептидными связями между альфа-аминными и карбонильными группами смежных аминокислот. Предпочтительно, если соли являются фармацевтически приемлемыми солями пептидов, такими как, например, хлорид или ацетат (трифторацетат). Было замечено, что соли пептидов в соответствии с настоящим изобретением существенно отличаются от пептидов в их состоянии(ях) *in vivo*, так как пептиды не являются солями *in vivo*.

Понятие "пептид" включает также понятие "олигопептид". Понятие "олигопептид" в контексте настоящего описания обозначает серии аминокислотных остатков, связанных друг с другом обычно пептидными связями между альфа-аминными и карбонильными группами смежных аминокислот. Длина олигопептида не особенно важна для изобретения до тех пор, пока в нем сохраняются надлежащие эпитоп или эпитопы. Олигопептиды типично бывают менее чем около 30 аминокислотных остатков в длину и более чем около 15 аминокислот в длину.

Понятие "полипептид" обозначает серии аминокислотных остатков, связанных один с другим типично пептидными связями между альфа-аминными и карбонильными группами смежных аминокислот. Длина полипептида не особенно важна для изобретения до тех пор, пока сохраняются надлежащие эпитопы. В отличие от терминов "пептид" или "олигопептид", термин "полипептид" введен для обозначения молекул, содержащих более приблизительно 30 аминокислотных остатков.

Пептид, олигопептид, белок или полинуклеотид, кодирующий такую молекулу, является "иммуногенным" (и, таким образом, "иммуногеном" в рамках настоящего изобретения), если он способен индуцировать иммунный ответ. В случае настоящего изобретения иммуногенность получает более специфическое определение как способность индуцировать Т-клеточный ответ. Таким образом, "иммуноген" будет представлять собой молекулу, которая способна индуцировать иммунный ответ, и, в случае настоящего изобретения молекулу, способную индуцировать Т-клеточный ответ. В другом аспекте иммуноген может быть пептидом, комплексом пептида и МНС, олигопептидом и(или) белком, используемым для получения специфических антител или ТКР против него.

Для Т-клеточного "эпитопа" I класса необходим короткий пептид, который связан с рецептором МНС I класса, образующим трехчленный комплекс (альфа-цепь МНС I класса, бета-2-микроглобулин и пептид), который может быть распознан Т-клеткой, несущей подходящий Т-клеточный рецептор, связывающийся с комплексом МНС/пептид с подходящей аффинностью. Пептиды, связывающиеся с молекулами МНС I класса, типично имеют длину в 8-14 аминокислот и, особенно типично, длину в 9 аминокислот.

У человека имеется три различных генетических локуса, которые кодируют молекулы МНС I класса (молекулы МНС человека называются также человеческими лейкоцитарными антигенами (HLA)): HLA-A, HLA-B и HLA-C. HLA-A*01, HLA-A*02 и HLA-A*07 являются примерами различных аллелей МНС I класса, которые могут экспрессироваться из этих локусов.

Таблица 1: Частоты экспрессии F HLA-A*02 и HLA-A*24 и наиболее частых серологических видов HLA-DR. Частоты экспрессии выведены из частот гаплотипа Gf среди американцев, приводимых в работе Mori и соавт. (Mori et al., 1997), с использованием формулы Харди-Вейнберга $F=1-(1-Gf)^2$. Комбинации A*02 или A*24 с определенными аллелями HLA-DR вследствие неравномерного распределения связей могут быть обогащенными или менее частыми, чем ожидается от их индивидуальных частот выявления. Более подробная информация представлена в работе Chanock и соавт. (Chanock et al., 2004).

Аллель	Популяция	Рассчитанный фенотип по частоте аллеля
A*02	Европеоидная раса (Северная Америка)	49,1%
A*02	Афроамериканцы (Северная Америка)	34,1%
A*02	Монголоиды (Северная Америка)	43,2%
A*02	Латиноамериканцы (Северная Америка)	48,3%
DR1	Европеоидная раса (Северная Америка)	19,4%
DR2	Европеоидная раса (Северная Америка)	28,2%
DR3	Европеоидная раса (Северная Америка)	20,6%
DR4	Европеоидная раса (Северная Америка)	30,7%
DR5	Европеоидная раса (Северная Америка)	23,3%
DR6	Европеоидная раса (Северная Америка)	26,7%
DR7	Европеоидная раса (Северная Америка)	24,8%
DR8	Европеоидная раса (Северная Америка)	5,7%
DR9	Европеоидная раса (Северная Америка)	2,1%
DR1	Афроамериканцы (Северная Америка)	13,20%
DR2	Афроамериканцы (Северная Америка)	29,80%
DR3	Афроамериканцы (Северная Америка)	24,80%
DR4	Афроамериканцы (Северная Америка)	11,10%
DR5	Афроамериканцы (Северная Америка)	31,10%
DR6	Афроамериканцы (Северная Америка)	33,70%
DR7	Афроамериканцы (Северная Америка)	19,20%
DR8	Афроамериканцы (Северная Америка)	12,10%
DR9	Афроамериканцы (Северная Америка)	5,80%
DR1	Монголоиды (Северная Америка)	6,80%
DR2	Монголоиды (Северная Америка)	33,80%
DR3	Монголоиды (Северная Америка)	9,20%
DR4	Монголоиды (Северная Америка)	28,60%
DR5	Монголоиды (Северная Америка)	30,00%
DR6	Монголоиды (Северная Америка)	25,10%
DR7	Монголоиды (Северная Америка)	13,40%
DR8	Монголоиды (Северная Америка)	12,70%
DR9	Монголоиды (Северная Америка)	18,60%
DR1	Латиноамериканцы (Северная Америка)	15,30%
DR2	Латиноамериканцы (Северная Америка)	21,20%
DR3	Латиноамериканцы (Северная Америка)	15,20%
DR4	Латиноамериканцы (Северная Америка)	36,80%
DR5	Латиноамериканцы (Северная Америка)	20,00%
DR6	Латиноамериканцы (Северная Америка)	31,10%
DR7	Латиноамериканцы (Северная Америка)	20,20%
DR8	Латиноамериканцы (Северная Америка)	18,60%
DR9	Латиноамериканцы (Северная Америка)	2,10%
A*24	Филиппины	65%
A*24	Русские ненцы	61%
A*24:02	Япония	59%
A*24	Малайзия	58%
A*24:02	Филиппины	54%
A*24	Индия	47%
A*24	Южная Корея	40%
A*24	Шри-Ланка	37%
A*24	Китай	32%
A*24:02	Индия	29%
A*24	Западная Австралия	22%
A*24	США	22%
A*24	Россия, Самара	20%
A*24	Южная Америка	20%
A*24	Европа	18%

Пептиды по изобретению, предпочтительно когда они включены в состав вакцины по изобретению

согласно описанию в настоящем документе, связываются с аллелью A*02. Вакцина также может включать универсальные пептиды, связывающиеся с МНС II класса. Поэтому вакцина по изобретению может применяться для лечения рака у пациентов, которые являются A*02-положительными, причем в связи с универсальной по связыванию природе данных пептидов не нужен подбор аллотипов МНС II класса.

Если пептиды A*02 по изобретению скомбинировать с пептидами, связывающимися с другим аллелем, например A*24, лечение может пройти более высокий процент любой популяции пациентов по сравнению с вакцинацией для каждого аллеля МНС I класса в отдельности. Тогда как в большинстве популяций любым одним аллелем могут быть охвачены менее чем 50% пациентов, вакциной, включающей эпитопы HLA-A*24 и HLA-A*02 можно лечить не менее 60% пациентов любой соответствующей популяции. Говоря конкретно, следующие процентные доли пациентов будут положительными по меньшей мере для одного из этих аллелей в различных регионах: США - 61%, Западная Европа - 62%, Китай - 75%, Южная Корея - 77%, Япония - 86% (рассчитано по данным www.allelefrequencies.net).

В предпочтительном варианте осуществления понятие "нуклеотидная последовательность" относится к гетерополимеру дезоксирибонуклеотидов.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая конкретный пептид, олигопептид или полипептид, может быть встречающейся в природе или может быть синтезирована. В целом, сегменты ДНК, кодирующие пептиды, полипептиды и белки данного изобретения, собраны из фрагментов кДНК и коротких олигонуклеотидных линкеров или же из серий олигонуклеотидов для получения синтетического гена, который способен экспрессироваться в рекомбинантной транскрипционной единице, включающей регуляторные элементы, образованные из микробного или вирусного оперона.

В контексте настоящего описания понятие "нуклеотид, кодирующий пептид", относится к нуклеотидной последовательности, кодирующей пептид, включая искусственные (сделанные человеком) старт-и стоп-кодоны, совместимые с биологической системой, которой должна экспрессироваться последовательность, например, дендритная клетка или другая клеточная система, пригодная для получения ТКР.

Используемая в контексте данного описания ссылка на последовательность нуклеиновой кислоты включает как однонитевую, так и двухнитевую нуклеиновую кислоту. Таким образом, например, для ДНК специфическая последовательность, если в контексте не указано иное, относится к однонитевой ДНК такой последовательности, дуплексу такой последовательности с его комплементом (двухнитевая ДНК) и комплементу такой последовательности.

Понятие "кодирующая область" относится к тому участку гена, который в естественных или обычных условиях кодирует продукт экспрессии того гена в его естественном геномном окружении, т.е., участку, кодирующему *in vivo* нативный продукт экспрессии гена.

Кодирующая область может быть получена из не мутировавшего ("нормального"), мутировавшего или измененного гена или может даже быть получена из последовательности ДНК, или же гена, целиком синтезированного в лаборатории с использованием методов, хорошо известных специалистам области синтеза ДНК.

Понятие "продукт экспрессии" означает полипептид или белок, являющийся природным продуктом трансляции гена и любой последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует эквиваленты, образующиеся в результате вырождения генетического кода и, таким образом, кодирует ту/те же самую(ые) аминокислоту(ы).

Понятие "фрагмент", если относится к кодирующей последовательности, означает участок ДНК, включающий меньше, чем полную кодирующую область, продукт экспрессии которого по существу сохраняет ту же самую биологическую функцию или активность, что и продукт экспрессии полной кодирующей области.

Понятие "сегмент ДНК" относится к полимеру ДНК в виде отдельного фрагмента или в качестве компонента более крупной конструкции ДНК, которая была образована из ДНК, выделенной по меньшей мере один раз в по существу чистой форме, т.е., без контаминирующих эндогенных материалов и в количестве или с концентрацией, позволяющей идентификацию, манипуляцию и восстановление сегмента и его составных нуклеотидных последовательностей стандартными биохимическими методами, например, с использованием вектора для клонирования. Такие фрагменты предлагаются в форме открытой рамки считывания, не прерываемой внутренними не-транслированными последовательностями или интронами, которые обычно присутствуют в эукариотических генах. Последовательности нетранслированной ДНК могут присутствовать за открытой рамкой считывания, где она не интерферирует с манипуляцией или экспрессией кодирующих областей.

Понятие "праймер" означает короткую последовательность нуклеиновой кислоты, которая может быть спарена с одной нитью ДНК с получением свободного конца 3'ОН, на котором ДНК-полимераза начинает синтезировать дезоксирибонуклеотидную цепь.

Понятие "промотор" означает участок ДНК, задействованный в связывании РНК-полимеразы для инициации транскрипции.

Понятие "выделенный" означает, что материал удален из его исходного окружения (к примеру, естественного окружения, если он встречается в природе). Например, встречающийся в природе полинуклеотид или полипептид, представленный в живых организмах, не является выделенным, но тот же самый

полинуклеотид или полипептид, отделенный от некоторых или всех сосуществующих материалов природной системы, является выделенным. Такие полинуклеотиды могли быть частью вектора и(или) такие полинуклеотиды или полипептиды могли быть частью композиции и все-таки могли быть выделены, так что такой вектор или композиция не является частью своего естественного окружения.

Полинуклеотиды и рекомбинантные или иммуногенные полипептиды, раскрытые в соответствии с настоящим изобретением, могут также быть в "очищенной" форме. Понятие "очищенный" не требует абсолютной чистоты; скорее оно предназначено для дачи относительного определения и может включать препараты с высокой очисткой или препараты только с частичной очисткой, в соответствии с тем, как эти термины понимаются специалистами соответствующей области. Например, отдельные клоны, выделенные из библиотеки кДНК, как обычно очищались до электрофоретической гомогенности. Очистка исходного материала или природного материала от примесей по меньшей мере на один порядок величины, предпочтительно два или три порядка, и, более предпочтительно, четыре или пять порядков величины определенно рассматривается в изобретении. Более того, определенно включен заявленный полипептид, чистота которого составляет предпочтительно 99,999% или по меньшей мере 99,99% или 99,9%; и даже желательно 99% по массе или более.

Нуклеиновые кислоты и полипептиды как продукты экспрессии, раскрываемые в соответствии с настоящим изобретением, в равной степени, как и векторы экспрессии, содержащие такие нуклеиновые кислоты и(или) такие полипептиды, могут быть в "обогащенной форме". Используемый здесь термин "обогащенный" означает, что концентрация материала по меньшей мере приблизительно в 2, 5, 10, 100 или 1000 раз выше его естественной концентрации (например), преимущественно 0,01% по массе, предпочтительно по меньшей мере около 0,1% по массе. Рассматриваются также обогащенные препараты с концентрацией примерно 0,5, 1, 5, 10 и 20% по массе. Последовательности, конструкции, векторы, клоны и другие материалы, включенные в настоящее изобретение, могут быть предпочтительно в обогащенной форме или выделенными. Понятие "активный фрагмент" означает фрагмент - обычно пептида, полипептида или последовательности нуклеиновой кислоты, - который дает иммунный ответ (т.е. обладает иммуногенной активностью), если он введен отдельно или факультативно с подходящим адъювантом или в векторе животному, такому как млекопитающее, например, кролику или мыши, также включая человека; причем такой иммунный ответ принимает форму стимуляции Т-клеточного ответа у животного-реципиента, такого как человек. Альтернативно "активный фрагмент" может также быть использован для инициации ответа Т-клетки *in vitro*.

В контексте настоящего описания понятия "участок", "сегмент" и "фрагмент", если они использованы по отношению к полипептидам, относятся к непрерывной последовательности остатков, таких как аминокислотные остатки, последовательность которых формирует подкласс более крупной последовательности. Например, если полипептид был подвергнут обработке любой из известных эндопептидаз, таких как трипсин или химотрипсин, то полученные в результате такой обработки олигопептиды будут представлять участки, сегменты или фрагменты исходного полипептида. При использовании по отношению к полинуклеотидам эти понятия относятся к продуктам, полученным при обработке указанных полинуклеотидов любой из эндонуклеаз.

В соответствии с настоящим изобретением понятие "процентная доля идентичности" или "идентичный с процентной долей", если оно относится к последовательности, означает, что последовательность сравнивается с заявленной или описанной последовательностью после выравнивания сравниваемой последовательности ("Сравниваемая последовательность") с описанной или заявленной последовательностью ("Контрольная последовательность"). Процентная доля идентичности определяется затем по следующей формуле:

$$\text{процентная доля идентичности} = 100 [1 - (C/R)]$$

где "C" является числом различий между Контрольной последовательностью и Сравниваемой последовательностью по длине выравнивания между Контрольной последовательностью и Сравниваемой последовательностью, где

- (i) каждое основание или аминокислота в Контрольной последовательности, которые не имеют соответствующего выравненного основания или аминокислоты в Сравниваемой последовательности,
 - (ii) каждая брешь в Контрольной последовательности и
 - (iii) каждое выравненное основание или аминокислота в Контрольной последовательности, которые отличаются от выравненного основания или аминокислоты в Сравниваемой последовательности, представляют собой различие; и
 - (iiii) выравнивание должно начинаться с позиции 1 выравненных последовательностей;
- и "R" - это число оснований или аминокислот в Контрольной последовательности по длине выравнивания со Сравниваемой последовательностью с любой брешью, образующейся в Контрольной последовательности, считающейся также за основание или аминокислоту.

Если существует противопоставление между Сравниваемой последовательностью и Контрольной последовательностью, для которых процентная доля идентичности, по расчетам выше, приблизительно равна или выше установленной минимальной Процентной доли идентичности, тогда Сравниваемая последовательность имеет установленную минимальную процентную долю идентичности с Контрольной

последовательностью, если даже могут существовать выравнивания, в которых подсчитанная здесь выше процентная доля идентичности меньше, чем установленная процентная доля идентичности.

Как было упомянуто ранее, в настоящем изобретении, таким образом, предложен пептид, включающий последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 288 или ее вариант, который на 88% гомологичен последовательностям с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 288, или их варианту, который будет индуцировать Т-клеточную перекрестную реакцию с указанным пептидом. Пептиды по изобретению обладают способностью связываться с молекулой главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) I класса или - удлинённые версии упомянутых пептидов - с МНС II класса.

В настоящем изобретении термин "гомологичный" относится к степени идентичности (см. выше, Процентная доля идентичности) между последовательностями двух аминокислотных последовательностей, т.е. пептидных или полипептидных последовательностей. Упомянутая ранее "гомология" определяется при сравнении двух последовательностей, сопоставляемых в оптимальных условиях для сравниваемых последовательностей. Такая гомология последовательностей может быть подсчитана с помощью создания выравнивания, например, по алгоритму ClustalW. Широко распространено программное обеспечение для анализа последовательностей, в частности, Vector NTI, GENETYX или другие инструменты, предоставляемые банками данных свободного доступа.

Специалист данной области будет в состоянии оценить, будут ли Т-клетки, индуцированные вариантом конкретного пептида, способны к перекрестной реакции с самим пептидом (Appay et al., 2006; Colombetti et al., 2006; Fong et al., 2001; Zaremba et al., 1997).

Под "вариантом" данной аминокислотной последовательности авторы изобретения имеют в виду, что боковые цепи, например, одного или двух аминокислотных остатков, изменены (например, при их замещении боковой цепью другого встречающегося в природе аминокислотного остатка или какой-либо другой боковой цепью), так что пептид по-прежнему способен связываться с молекулой HLA по существу таким же путем, как и пептид, состоящий из данной аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 288. Например, пептид может быть модифицирован таким образом, что он по меньшей мере сохранит, если не улучшит, способность взаимодействовать и связываться со связывающей бороздкой подходящей молекулы МНС, такой как HLA-A*02 или -DR, и, таким образом, он, по меньшей мере, сохранит, если не улучшит, способность связываться с ТКР активированных Т-клеток.

Данные Т-клетки могут затем вступать в перекрестную реакцию с клетками и уничтожать клетки, которые экспрессируют полипептид, который содержит природную аминокислотную последовательность родственного пептида, как определено в аспектах этого изобретения. По информации из научной литературы и банков данных (Rammensee et al., 1999; Godkin et al., 1997), конкретные позиции связывающихся с HLA пептидов являются типичными якорными остатками, формирующими центральную последовательность, подходящую к соединительному элементу рецептора HLA, который определяется полярными, электрофизическими, гидрофобными и пространственными свойствами полипептидных цепей, образующих связывающую бороздку. Так, специалист данной области будет в состоянии модифицировать аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 288, сохраняя известные якорные остатки, и будет в состоянии определить, сохранят ли такие варианты способность связываться с молекулами МНС I или II класса. Варианты по настоящему изобретению сохраняют способность связываться с ТКР активированных Т-клеток, которые могут впоследствии вступать в перекрестную реакцию и уничтожать клетки, экспрессирующие полипептид, который содержит природную аминокислотную последовательность родственного пептида, как определено в аспектах настоящего изобретения.

Исходные (немодифицированные) пептиды, раскрываемые в данном описании, могут быть модифицированы путем замены одного или нескольких остатков в различных, возможно отобранных, участках по длине пептидной цепи, если не заявлено иное. Предпочтительно, если такие замены расположены на конце аминокислотной цепи. Такие замены могут носить консервативный характер, например, когда одна аминокислота заменяется аминокислотой с похожей структурой и характеристиками, так же как при замене гидрофобной аминокислоты на другую гидрофобную аминокислоту. Еще более консервативной будет замена аминокислот одинакового или похожего размера и химического характера, как, например, при замене лейцина на изолейцин. В исследованиях вариаций последовательностей внутри семейств встречающихся в природе гомологичных белков определенные замены аминокислот допускаются чаще, чем другие, и они часто связаны со сходствами по размеру, заряду, полярности и гидрофобности между исходной аминокислотой и ее заменой; и таковой является основа определения "консервативных замен".

Консервативные замены определены в контексте настоящего описания как обмены внутри одной из последующих пяти групп: группа 1 - малые, алифатические, неполярные или слабо полярные остатки (Ala, Ser, Thr, Pro, Gly); группа 2 - полярные, отрицательно заряженные остатки и их амиды (Asp, Asn, Glu, Gln); группа 3 - полярные, положительно заряженные остатки (His, Arg, Lys); группа 4 - крупные, алифатические, неполярные остатки (Met, Leu, Ile, Val, Cys) и группа 5 - крупные, ароматические остатки (Phe, Tyr, Trp).

Менее консервативные замены могут охватывать замену одной аминокислоты другой, имеющей похожие характеристики, но отличающейся в какой-то степени по размеру, как в случае замены аланина

остатком изолейцина. Высоко неконсервативные замены могут охватывать замену кислой аминокислоты полярной, или даже такой, которая имеет основной характер. Такие "радикальные" замены не могут, однако, быть отвергнуты как потенциально неэффективные из-за того, что химические эффекты не полностью предсказуемы, и радикальные замены могут неожиданно привести к благоприятным эффектам, не предсказуемым исходя из обычных химических принципов.

Разумеется, в таких заменах могут участвовать другие структуры, отличающиеся от обычных L-аминокислот. Таким образом, D-аминокислоты могут быть заменены L-аминокислотами, обычно встречающимися в антигенных пептидах по изобретению и также охватываемые настоящим раскрытием сущности изобретения. Кроме того, нестандартные аминокислоты (т.е. отличающиеся от повсеместно встречающихся протеиногенных аминокислот) могут быть также использованы в целях замены для получения иммуногенов и иммуногенных полипептидов в соответствии с настоящим изобретением.

Если были произведены замены в более чем одной позиции с получением пептида с, по существу, эквивалентной или большей антигенной активностью, как определено ниже, то комбинации таких замен будут проанализированы для определения того, приведут ли эти комбинации замен к дополнительным или синергическим эффектам по отношению к антигенности пептида. По большей части не более четырёх позиций внутри пептида должны замещаться одновременно.

Пептид, состоящий, по существу, из аминокислотной последовательности, как указано в настоящей заявке, может иметь замену одной или двух неякорных аминокислот (см. ниже относительно якорного мотива), так что способность связываться с молекулой главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) I или II класса не будет существенно изменена или подвергнута негативному влиянию по сравнению с немодифицированным пептидом. В другом варианте осуществления в пептиде, состоящем, по существу, из аминокислотной последовательности, как указано в настоящей заявке, одна или две аминокислоты могут быть заменены партнерами по консервативной замене (см. информацию ниже), так что способность связываться с молекулой главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) I или II класса не будет существенно изменена или подвергнута негативному влиянию по сравнению с немодифицированным пептидом.

Аминокислотные остатки, которые не вносят существенный вклад во взаимодействие с Т-клеточным рецептором, могут быть модифицированы заменой на другие аминокислоты, включение которых существенно не влияет на реактивность Т-клетки и не устраняет связывание с соответствующим МНС. Таким образом, помимо данного условия, пептид по изобретению может быть любым пептидом (в этот термин авторы изобретения включают олигопептиды или полипептиды), который включает аминокислотные последовательности или их участок или их вариант, как дано.

Таблица 2. Варианты и мотив пептидов в соответствии с SEQ ID NO: 4, 13 и 15

Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO. 4	V	L	F	G	E	L	P	A	L
Варианты									V
									I
									A
		M							V
		M							I
		M							
		M							A
		A							V
		A							I
		A							
		A							A
		V							V
		V							I
		V							
		V							A
		T							V
		T							I
		T							
		T							A
		Q							V
		Q							I
		Q							
		Q							A
Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO. 15	G	L	P	S	A	T	T	T	V
Варианты		I							L
		I							I
		I							
		I							A
		M							L
		M							I
		M							
		M							A
		A							L
		A							I
		A							
		A							A
		V							L
		V							I
		V							
		V							A
		T							L

		T							I
		T							
		T							A
		Q							L
		Q							I
		Q							
		Q							A
Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO. 13	R	L	H	D	E	N	I	L	L
									V
									I
									A
		M							V
		M							I
		M							
		M							A
		A							V
		A							I
		A							
		A							A
		V							V
		V							I
		V							
		V							A
		T							V
		T							I
		T							
		T							A
		Q							V
		Q							I
		Q							
		Q							A

Более длинные (удлиненные) пептиды также могут быть пригодными. Возможно, чтобы эпитопы, связывающиеся с молекулами МНС I класса, хотя они обычно имеют длину между 8 и 11 аминокислотами, были получены при процессинге пептидов из более длинных пептидов или белков, включающих истинный эпитоп. Предпочтительно, чтобы остатки, которые примыкают к истинному эпитопу, существенно не влияли на протеолитическое расщепление, необходимое для презентации истинного эпитопа во время процессинга.

Пептиды по изобретению могут быть удлинены с помощью вплоть до четырех аминокислот, это значит, что 1, 2, 3 или 4 аминокислоты могут быть добавлены к одному из концов в любой комбинации, представленной между 4:0 и 0:4. Комбинации элонгаций в соответствии с изобретением могут быть взяты из табл. 3.

Таблица 3. Комбинации элонгаций пептидов по изобретению

С-конец	N-конец
4	0
3	0 или 1
2	0 или 1 или 2
1	0 или 1 или 2 или 3
0	0 или 1 или 2 или 3 или 4
N-конец	С-конец
4	0
3	0 или 1
2	0 или 1 или 2
1	0 или 1 или 2 или 3
0	0 или 1 или 2 или 3 или 4

Аминокислотами для элонгации/удлинения могут быть пептиды исходной последовательности белка или любая(ые) другая(ие) аминокислота(ы). Элонгация может быть использована для повышения стабильности или растворимости пептидов.

Таким образом, эпитопы настоящего изобретения могут быть идентичны встречающимся в природе опухолеассоциированным или опухолеспецифическим эпитопам или могут включать эпитопы, отличающиеся не более чем четырьмя остатками от контрольного пептида, при условии, что они имеют, по существу, идентичную антигенную активность.

В альтернативном варианте осуществления пептид удлинен с одной или другой стороны или с двух

сторон одновременно добавлением более 4 аминокислот, предпочтительно до общей длины вплоть до 30 аминокислот. Это может привести к образованию пептидов, связывающихся с МНС II класса. Связывание с МНС II класса может быть проверено известными из уровня техники способами.

Соответственно, в настоящем изобретении предлагаются пептидные эпитопы и эпитопы пептидных вариантов, связывающихся с молекулами МНС I класса, в которых указанный пептид или вариант имеет общую длину между 8 и 100, предпочтительно между 8 и 30 и наиболее предпочтительно между 8 и 14, а именно 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 аминокислот, в случае удлиненных пептидов, связывающихся с молекулами МНС II класса, длина может также быть 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 аминокислоты.

Разумеется, пептид или вариант в соответствии с настоящим изобретением будет обладать способностью связываться с молекулой главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) I или II класса. Связывание пептида или варианта с комплексом МНС может быть проверено способами, известными из уровня техники.

Предпочтительно, чтобы Т-клетки, специфичные для пептида в соответствии с настоящим изобретением были испытаны относительно замещенных пептидов; концентрация пептида, при которой замещенные пептиды достигают половины максимального роста лизиса относительно фона, составляет не более чем около 1 мМ, предпочтительно, не более чем около 1 мкМ, более предпочтительно, не более чем около 1 нМ и еще более предпочтительно не более чем около 100 пМ и наиболее предпочтительно не более чем около 10 пМ. Также предпочтительно, чтобы замещенный пептид распознавался Т-клетками более чем одного индивида, по меньшей мере двух и более предпочтительно трех индивидов.

В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения пептид состоит или по существу состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 288.

"Состоит по существу из" подразумевает, что пептид в соответствии с настоящим изобретением, помимо любой из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 288, или его вариант, содержит дополнительные находящиеся на N- и(или) С-конце фрагменты последовательности аминокислот, которые не являются обязательно формирующими часть пептида, которая функционирует как эпитоп для молекул МНС.

Тем не менее, эти фрагменты могут быть важны для обеспечения эффективного введения пептида в соответствии с настоящим изобретением в клетки. В одном варианте осуществления настоящего изобретения пептид является частью слитого белка, которая включает, например, 80 N-терминальных аминокислот антиген-ассоциированной инвариантной цепи (p33, в дальнейшем "Ii") HLA-DR, как взятый из банка данных NCBI, инвентарный номер - GenBank Accession-number X00497. В других видах слияния пептиды по настоящему изобретению могут быть слиты с антителом, описанным в настоящем документе, или его функциональной частью, в частности встроены в последовательность антитела, так чтобы быть специфической мишенью указанного антитела, или, например, слиты с или встроены в антитело, являющееся специфичным для дендритных клеток, описанных в настоящей заявке.

Кроме того, пептид или вариант может быть дополнительно модифицирован для улучшения стабильности и(или) связывания с молекулами МНС в целях получения более сильного иммунного ответа. Методы такой оптимизации пептидной последовательности хорошо известны из уровня техники и включают, например, введение реверсированных пептидных или непептидных связей.

В реверсированной пептидной связи аминокислотные остатки присоединены не пептидными связями (-CO-NH-), а пептидная связь реверсируется. Такие ретро-обратные пептидомиметики могут быть получены методами, известными из уровня техники, например, такими, как описано в работе Meziere и соавт. (1997) (Meziere et al., 1997), включенной в настоящее описание по ссылке. Этот подход охватывает получение псевдопептидов, которые содержат изменения, охватывающие остов, но не ориентацию боковых цепей. Meziere и соавт. (Meziere et al., 1997) показывают, что эти псевдопептиды пригодны для связывания с МНС и индукции ответов Т-хелперных клеток. Ретро-обратные пептиды, которые содержат связи NH-CO вместо пептидных связей CO-NH, намного более устойчивы к протеолизу.

Непептидной связью является, например, -CH₂-NH-, -CH₂S-, -CH₂CH₂-, -CH=CH-, -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- и -CH₂SO-. В патенте США № 4897445 предлагается метод твердофазного синтеза непептидных связей (-CH₂-NH) в полипептидных цепях, который включает полипептиды, синтезированные с использованием стандартной методики, и непептидную связь, синтезированную при реакции аминокислоты и аминокислоты в присутствии NaCNBH₃.

Пептиды, включающие последовательности, описанные выше, могут быть синтезированы с дополнительными химическими группами, находящимися на их аминном и(или) карбоксильном концах, для увеличения стабильности, биологической доступности и(или) аффинности пептидов. Например, гидрофобные группы, такие как карбобензоксильные, данзилльные или трет-бутилоксикарбонильные группы, могут быть добавлены к аминным концам пептидов. Подобным образом, ацетильная группа или 9-флуоренилметокси-карбонильная группа может быть размещена на аминных концах пептидов. Кроме того, гидрофобная группа, трет-бутилоксикарбонильная или амидная группа может быть добавлена к карбоксильным концам пептидов.

Кроме того, все пептиды по изобретению могут быть синтезированы в целях изменения их пространственной конфигурации. Например, может быть использован D-изомер одного или нескольких

аминокислотных остатков пептида, а не обычный L-изомер. Более того, по меньшей мере один из аминокислотных остатков пептидов по изобретению может быть замещен одним из хорошо известных не встречающихся в природе аминокислотных остатков. Изменения, такие как данные, могут служить для повышения стабильности, биологической доступности и(или) связывающих свойств пептидов по изобретению.

Подобным образом, пептид или вариант по изобретению может быть модифицирован химическим способом посредством реакции отдельных аминокислот как до, так и после синтеза пептида. Примеры таких модификаций хорошо известны из уровня техники и обобщаются, например, в работе R. Lundblad, *Chemical Reagents for Protein Modification*, 3rd ed. CRC Press, 2004 (Lundblad, 2004), которая включена в описание по ссылке. Химическая модификация аминокислот включает, но без ограничения, модификацию с помощью ацилирования, амидинирования, пиридоксирования лизина, восстановительного алкилирования, тринитробензилирования аминных групп 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислотой (TNBS), амидную модификацию карбоксильных групп и сульфгидрильную модификацию с помощью окисления надмуравьиной кислотой цистеина до цистеиновой кислоты, образование производных ртути, образование смешанных дисульфидов с другими тиоловыми соединениями, реакцию с малеимидом, карбоксиметилирование йодоуксусной кислотой или йодацетамидом и карбамоилирование цианатом при щелочном уровне pH, хотя не ограничиваясь ими. В этой связи специалист данной области может проконсультироваться с главой 15 в работе *Current Protocols In Protein Science*, Eds. Hassan и соавт. (John Wiley and Sons NY 1995-2000) (Coligan et al., 1995) для получения более обширной информации о методах, связанных с химической модификацией белков.

Вкратце, модификация, например, аргининовых остатков в белках часто основана на реакции вицинальных дикарбонильных соединений, таких как фенилглиоксаль, 2,3-бутандион и 1,2-циклогександион, с образованием аддукта. Другим примером является реакция метилглиоксаля с остатками аргинина. Цистеин может быть модифицирован без сопутствующей модификации других нуклеофильных сайтов, таких как лизин и гистидин. В результате для модификации цистеина доступно большое число реагентов. Веб-сайты компаний, таких как Sigma-Aldrich (<http://www.sigma-aldrich.com>), предоставляют информацию по конкретным реагентам.

Распространено также избирательное восстановление дисульфидных связей в белках. Дисульфидные связи могут быть образованы и окислены во время тепловой обработки биофармацевтических средств. К-реагент Вудворда может использоваться для модификации определенных остатков глутаминовой кислоты. N-(3-(диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимид может использоваться для образования внутримолекулярных поперечных связей между остатком лизина и остатком глутаминовой кислоты. Например, диэтилпирокарбонат является реагентом для модификации гистидиновых остатков в белках. Гистидин может также быть модифицирован при использовании 4-гидрокси-2-ноненаля. Реакция остатков лизина и других α -аминных групп полезна, например, при связывании пептидов с поверхностями или поперечной сшивке белков/пептидов. Лизин является сайтом присоединения полиэтиленгликоля и основным сайтом модификации при гликозилировании белков. Остатки метионина в белках могут быть модифицированы, например, с помощью йодацетамида, бромэтиламина и хлорамина T.

Тетранитрометан и N-ацетилимидазол могут быть использованы для модификации тирозиновых остатков. Поперечная сшивка посредством образования дитирозина может быть произведена с помощью перекиси водорода/ионов меди.

В последних исследованиях по модификации триптофана использовались N-бромсукцинимид, 2-гидрокси-5-нитробензилбромид или 3-бром-3-метил-2-(2-нитрофенилмеркапто)-3H-индол (BPNS-скатол).

Успешная модификация терапевтических белков и пептидов ПЭГ (полиэтиленгликолем) часто связана с увеличением полупериода циркуляции, тогда как поперечная сшивка белков глутаральдегидом, полиэтиленгликоль-диакрилатом и формальдегидом используется для получения гидрогелей. Химическая модификация аллергенов для иммунотерапии часто достигается при карбамоилировании цианатом калия.

Пептид или вариант, в котором пептид модифицирован или включает непептидные связи, является предпочтительным вариантом осуществления изобретения. Как правило, пептиды и варианты (по меньшей мере те, что содержат пептидные связи между аминокислотными остатками) могут быть синтезированы Fmoc-полиамидным способом твердофазного синтеза пептидов, как раскрыто у Lukas и соавт. (Lukas et al., 1981) и в прилагающихся ссылках. Временная защита N-аминогруппы производится 9-флуоренилметилоксикарбонильной (Fmoc) группой. Повторное расщепление этой высоко щелочлабильной защитной группы осуществляется при использовании 20% пиперидина в N,N-диметилформамиде. Функциональные группы боковой цепи могут быть защищены получением таких соединений, как их бутиловые эфиры (в случае серина, треонина и тирозина), бутиловые сложные эфиры (в случае глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты), бутилоксикарбонильное производное (в случае лизина и гистидина), тритильное производное (в случае цистеина) и производное 4-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфонила (в случае аргинина). Если глютамин или аспарагин являются C-терминальными остатками, для защиты амидогруппы боковой цепи используется 4,4'-

диметоксибензгидрильная группа. Твердофазный носитель основан на полимере полидиметилакриламиде, состоящем из трех мономеров: диметилакриламида (каркасный мономер), бис-акрилоил-этилендиамина (компонент для перекрестной сшивки, линкер) и метилового эфира акрилоилсаркозина (функционализирующий агент). Для образования легкорасщепляемой связи пептида и смолы используется нестойкое к действию кислот производное 4-гидроксиметилфеноксисукусной кислоты. Все аминокислотные производные добавляются в виде предварительно синтезированных симметричных ангидридных производных за исключением аспарагина и глутамина, которые добавляются с применением обратной реакции соединения, опосредованной N,N-дициклогексилкарбодиимид/1-гидроксibenзотриазолом. Все реакции сочетания и снятия защитных групп отслеживались с помощью методов контроля с применением нингидрина, тринитробензолсульфоновой кислоты или изотина. После завершения синтеза пептиды отщепляются от смолы-носителя с сопутствующим удалением защитных групп боковой цепи при обработке 95% трифторуксусной кислотой, содержащей 50% смеси поглотителей. Обычно используемые поглотители включают этандитиол, фенол, анизол и воду, окончательный выбор зависит от составляющих аминокислот синтезируемого пептида. Также возможна комбинация твердофазных и жидкофазных методов синтеза пептидов (см., например, (Bruckdorfer et al., 2004), и прилагаемые ссылки).

Трифторуксусную кислоту удаляют выпариванием в вакууме с последующим измельчением с диэтиловым эфиром для получения сырого пептида. Любые присутствующие поглотители удаляются простой технологией экстракции, которая позволяет получить сырой пептид без поглотителей после лиофилизации водной фазы. Реагенты для синтеза пептидов, как правило, имеются в наличии, например, в Calbiochem-Novabiochem (Ноттингем, Великобритания).

Очистка может быть произведена любой методикой или комбинацией таких методик как перекристаллизация, эксклюзионная хроматография, ионообменная хроматография, хроматография гидрофобного взаимодействия и (обычно) обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография с использованием, к примеру, градиентного разделения в системе ацетонитрил/вода.

Анализ пептидов может быть произведен при помощи тонкослойной хроматографии, электрофореза, в частности капиллярного электрофореза, твердофазной экстракции (ТФЭ), обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии, аминокислотного анализа после кислотного гидролиза и масс-спектрометрического анализа при бомбардировке быстрыми атомами (FAB), а также масс-спектрометрического анализа MALDI и ESI-Q-TOF.

В целях идентификации пептидов по настоящему изобретению в банке данных с общедоступными данными по экспрессии РНК (Lonsdale, 2013) из приблизительно 3000 образцов нормальных тканей был проведен поиск генов с практически отсутствующей экспрессией в системах жизненно важных органов и низким уровнем экспрессии в других системах важных органов. На втором этапе с помощью масс-спектрометрического анализа с использованием платформы XPRESIDENT™, описанной в настоящей заявке, были идентифицированы раково-ассоциированные пептиды, образованные из белковых продуктов данных генов.

Конкретнее, для отбора интересующих генов с использованием данных о последовательностях РНК (RNASeq) указанного банка данных в качестве жизненно важных систем органов рассматривали: головной мозг, сердце, кровеносные сосуды, легкие и печень. Для выбора гена требовалось, чтобы медианное число ридов на тысячу пар нуклеотидов, отнесенное на миллион ридов (RPKM) для жизненно важных органов, составляло менее 2, и чтобы 75-ый перцентиль составлял менее чем 5 RPKM. Если системы органов были охвачены более чем одним классом образцов, например, различные участки головного мозга, которые были проанализированы в отдельности, то для подсчетов использовали максимальное медианное значение и максимальный 75-ый перцентиль для нескольких классов образцов. Другими важными системами органов считались: кожа, нервы, гипофиз, толстая кишка, почка, жировая ткань, надпочечная железа, мочевого пузырь, цельная кровь, пищевод, мышца, поджелудочная железа, слюнная железа, тонкая кишка, желудок, молочная железа, селезенка, щитовидная железа. Для выбора гена максимальное медианное значение RPKM для данных органов должно было составлять менее 10. Другие органы рассматривали не как жизненно важные и, следовательно, к ним не применяли пороговое значение экспрессии гена. Данными органами были шейка матки и матка, маточная труба, влагалище, предстательная железа, семенник и яичник. С помощью данного скрининга было отобрано около 14 000 генов-кандидатов. Затем анализировали профили презентации пептидов, образованных из соответствующих белков. Пептиды рассматривали как представляющие интерес, если они презентировались на менее чем пяти нормальных образцах в наборе из более 170 нормальных (т.е. не пораженных раковым заболеванием) проанализированных образцов, и если наивысший уровень презентации в нормальной ткани составлял менее 30% медианного значения сигнала, полученного для опухоли (с учетом всех опухолевых образцов).

В целях выбора презентруемых в избытке пептидов был рассчитан профиль презентации, позволяющий оценить медианное значение презентации образца, а также вариации повторных измерений. В профиле сравниваются образцы опухолевой формы, представляющей интерес, с фоновым уровнем образцов нормальной ткани. Каждый из этих профилей может быть затем консолидирован в показатель избыточной презентации путем расчета значения p по линейной модели со смешанными эффектами (Pinheiro et al., 2015), скорректировав ее для повторных анализов на уровень ложноположительных результа-

тов (Benjamini and Hochberg, 1995).

Для идентификации и относительной количественной оценки лигандов HLA с помощью масс-спектрометрического анализа молекулы HLA из подвергнутых шоковой заморозке образцов тканей были очищены и из них выделены HLA-ассоциированные пептиды. Выделенные пептиды были разделены и последовательности были идентифицированы с помощью методов жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (LC-MS) с ионизацией электрораспылением (nanoESI) в режиме реального времени. Полученные пептидные последовательности подтверждали сравнением картины фрагментации природных пептидов TUMAP, записанной на первичных опухолевых образцах, с картинами фрагментации соответствующих синтетических контрольных пептидов с идентичными последовательностями. Поскольку пептиды были идентифицированы непосредственно в качестве лигандов молекул HLA первичных опухолей, то эти результаты дают прямое доказательство естественного процессирования и презентации идентифицированных пептидов на ткани первичной раковой опухоли.

Количества образцов (все вместе/прошедшие КК): для РПЖ N=39 (36), для ПКК N=22 (18), для КРК N=31 (28), для карциномы пищевода N=14 (11), для ДГПРЖ и рака предстательной железы N=53 (43), для ГKK N=15 (15), для НМРЛ N=96 (87), для РЖ N=35 (33), для ГБ N=38 (27), для рака молочной железы N=2 (2), для меланомы N=5 (2), для рака яичника N=21 (20), для ХЛЛ N=5 (4), для МРЛ N=18 (17), НХЛ N=18 (18), ОМЛ N=23 (18), РЖП, ХК N=18 (17), для РМП N=17 (15), для РЭМ N=19 (16). Образцами контроль качества был пройден, если было проведено 5 повторных измерений методом масс-спектрометрии, или образец был полностью использован, и пептиды, использованные для подсчета фактора нормализации (т.е. встречаемость в технических репликатах одного и того же образца при вариабельности, составляющей менее чем 50%, и встречаемость в не менее чем 2 независимых образцах), составляют не менее 30% всех пептидов, измеренных в образце. Образцы, которые после определения подтипа попадали в группу редкого подтипа (такие как A*02:05, A*02:06), были исключены из выбора пептидов настоящего изобретения.

Технологическая платформа лекарственных средств, находящихся в разработке, XPRESIDENT® v2.1 (см., например, патентную заявку США 2013-0096016, включенную в настоящее описание в своей полноте путем ссылки) позволяет произвести идентификацию и выбор соответствующих избыточно презентуемых пептидов в качестве кандидатов для вакцины, основываясь на прямом относительном количественном определении уровней HLA-рестриктированных пептидов на раковой ткани в сравнении с несколькими различными нераковыми тканями и органами. Это было осуществлено путем разработки дифференциального количественного определения на основе данных ЖХ-МС без использования изотопной метки (label-free), обработанных запатентованной технологической платформой для анализа данных, объединяющей алгоритмы для идентификации последовательности, спектральной кластеризации, подсчета ионов, выравнивания времени удерживания, деконволюции по состояниям заряда и нормализации.

Для каждого пептида и образца были подсчитаны уровни презентации, включающие оценки погрешности. Были идентифицированы пептиды, презентуемые исключительно на опухолевой ткани, и пептиды, избыточно презентуемые на опухолевых тканях в сравнении с не пораженными раком тканями и органами.

Комплексы HLA-пептид из первичных образцов ГKK, КРК, ГБ, РЖ, рака пищевода, НМРЛ, РПЖ, ПКК, ДГПРЖ/РПРЖ, РЯ, ККМ, меланомы, рака молочной железы, МРЛ, НХЛ, ОМЛ, РЖП, ХК, РМП, РЭМ и ХЛЛ были очищены и HLA-ассоциированные пептиды были выделены и проанализированы методом ЖХ/МС (см. примеры). Все пептиды TUMAP, содержащиеся в настоящей заявке, были идентифицированы с применением данного подхода на образцах ГKK, КРК, ГБ, РЖ, рак пищевода, НМРЛ, РПЖ, ПКК, ДГПРЖ/РПРЖ, РЯ, ККМ, меланомы, рака молочной железы, МРЛ, НХЛ, ОМЛ, РЖП, ХК, РМП, РЭМ и/или ХЛЛ, что подтвердило их презентацию на данных видах опухолей.

Пептиды TUMAP, идентифицированные на многочисленных образцах опухолей и нормальных тканей, были подвергнуты количественному анализу с помощью ЖХ/МС без изотопной метки, с использованием подсчета ионов. Метод основан на предположении, что площади пика пептида при анализе методом ЖХ/МС коррелируют с его содержанием в образце. Все количественные сигналы пептида в различных экспериментах с использованием ЖХ/МС были нормализованы, исходя из основной тенденции, было вычислено их среднее значение на образец, и сведены в гистограмму в т.н. профиль презентации. В профиле презентации консолидированы различные методы анализа, такие как поиск в банке данных белков, спектральная кластеризация, деконволюция состояния заряда (разряд) и выравнивание времени удерживания и нормализация.

Кроме того, технологическая платформа XPRESIDENT® v2.x позволяет поведение прямого абсолютного количественного определения уровня МНС-, предпочтительно HLA-рестриктированного, пептида на раковых или других пораженных заболеванием тканях. Вкратце, общее число клеток было подсчитано из общего содержания ДНК проанализированного образца ткани. Общее количество пептида TUMAP в образце ткани измеряли с помощью наноЖХ-МС/МС в виде соотношения природного пептида TUMAP и известного количества версии пептида TUMAP с изотопной меткой, так называемого внутреннего стандарта. Эффективность выделения пептида TUMAP определяли методом введения стандартной

добавки комплекса пептид-МНС всех выбранных пептидов TUMAP в лизат ткани в самый ранний возможный момент процесса выделения пептида TUMAP и их обнаружением с помощью наноЖХ-МС/МС, за чем следовало завершение процедуры выделения пептида. Общее число клеток и общее количество пептида были подсчитаны по трем повторным измерениям на образец ткани. Пептидспецифическую эффективность выделения подсчитывали как средний показатель из 10 экспериментов с введением стандартных добавок с тремя повторными измерениями для каждого (см. пример 6 и табл. 11).

Данный комбинированный метод анализа экспрессии РНК и данные спектрометрического анализа позволили выбрать 288 пептидов настоящего изобретения. Во многих случаях пептид идентифицировали только на ограниченном числе опухолей. Тем не менее, в связи с ограниченной чувствительностью рутинного масс-спектрометрического анализа данные по РНК представляют собой гораздо лучшую основу для оценки охвата (см. пример 2).

В настоящем изобретении предложены пептиды, которые полезны в лечении раковых заболеваний/опухолей, предпочтительно ГМК, КРК, ГБ, РЖ, рака пищевода, НМРЛ, РПЖ, ПКК, ДГПрЖ/РПрЖ, РЯ, ККМ, меланомы, рака молочной железы, МРЛ, НХЛ, ОМЛ, РЖП, ХК, РМП, РЭМ и ХЛЛ, которые избыточно или исключительно презентируют пептиды по изобретению. Данные пептиды, как показал масс-спектрометрический анализ, естественно презентировались молекулами HLA на образцах первичных ГМК, КРК, ГБ, РЖ, рака пищевода, НМРЛ, ПКК, ДГПрЖ/РПрЖ, РЯ, ККМ, меланомы, рака молочной железы, МРЛ, НХЛ, ОМЛ, РЖП, ХК, РМП, РЭМ, ХЛЛ, и/или образцах РПЖ человека.

Многие из исходных генов/белков (называемых также "белками полной длины" или "базовыми белками"), из которых были получены пептиды, были в высокой степени избыточно экспрессированы в клетках рака по сравнению с нормальными тканями - понятие "нормальные ткани" в связи с настоящим изобретением подразумевает здоровые клетки вида ткани, соответствующего опухоли (печени, толстой/прямой кишки, головного мозга, желудка, пищевода, легких, поджелудочной железы, почек, предстательной железы, яичника, кожи, молочной железы и лейкоциты) или другие нормальные клетки ткани, демонстрирующие высокую степень ассоциации исходных генов с опухолью (см. пример 2). Более того, сами пептиды в высшей степени избыточно презентируются на опухолевой ткани - понятие "опухолевая ткань" в связи с настоящим изобретением подразумевает образец ткани пациента, страдающего от ГМК, КРК, ГБ, РЖ, рака пищевода, НМРЛ, РПЖ, ПКК, ДГПрЖ/РПрЖ, РЯ, ККМ, меланомы, рака молочной железы, МРЛ, НХЛ, ОМЛ, РЖП, ХК, РМП, РЭМ или ХЛЛ, но не на нормальных тканях (см. пример 1).

Связанные с HLA пептиды могут распознаваться иммунной системой, конкретно Т-лимфоцитами. Т-клетки могут разрушать клетки, презентирующие распознанный комплекс HLA/пептид; к примеру, клетки ГМК, КРК, ГБ, РЖ, рака пищевода, НМРЛ, РПЖ, ПКК, ДГПрЖ/РПрЖ, РЯ, ККМ, меланомы, рака молочной железы, МРЛ, НХЛ, ОМЛ, РЖП, ХК, РМП, РЭМ или ХЛЛ, презентирующие полученные пептиды.

Было показано, что пептиды по настоящему изобретению способны стимулировать Т-клеточные ответы и(или) избыточно презентируются и поэтому могут использоваться для получения антител и/или ТКР, такие как растворимые ТКР, в соответствии с настоящим изобретением (см. пример 3, пример 4). Кроме того, пептиды, если находятся в комплексе с соответствующей молекулой МНС, могут быть использованы для получения антител и(или) ТКР, в частности растворимых ТКР, в соответствии с настоящим изобретением. Соответствующие способы хорошо известны специалисту данной области, а также могут быть найдены в соответствующих литературных источниках. Таким образом, пептиды по настоящему изобретению пригодны для генерирования иммунного ответа в организме пациента для уничтожения опухолевых клеток. Иммунный ответ у пациента может быть индуцирован при непосредственном введении описанных пептидов или подходящих веществ-предшественников (к примеру, удлиненных пептидов, белков или нуклеиновых кислот, кодирующих эти пептиды) пациенту, в идеальном случае в комбинации с веществом, усиливающим иммуногенность (т.е. адъювантом). Можно ожидать, что иммунный ответ, вызванный такой терапевтической вакцинацией, будет высоко специфично направлен против опухолевых клеток, так как целевые пептиды по настоящему изобретению не презентируются на нормальных тканях в сравнимом количестве копий, предотвращая, тем самым, риск нежелательных аутоиммунных реакций против нормальных клеток у пациента.

Настоящее описание далее относится к Т-клеточным рецепторам (ТКР), включающим альфа-цепь и бета-цепь ("альфа/бета-ТКР"). Также предложены пептиды, способные связываться с ТКР и антителами, если они презентируются молекулой МНС. Настоящее описание также относится к нуклеиновым кислотам, векторам и клеткам-хозяевам для экспрессии ТКР и пептидам по настоящему изобретению и методам их применения.

Понятие "Т-клеточный рецептор" (аббревиатура ТКР) относится к гетеродимерной молекуле, включающей альфа-полипептидную цепь (альфа-цепь) и бета-полипептидную цепь (бета-цепь), где гетеродимерный рецептор способен связываться с пептидным антигеном, презентруемым молекулой HLA. Это понятие включает также так называемые гамма/дельта-ТКР.

В одном варианте осуществления согласно описанию предложен способ получения ТКР, согласно настоящему описанию, при чем способ включает культивацию клетки-хозяина, способной экспрессиро-

вать ТКР в условиях, подходящих для стимуляции экспрессии ТКР.

Настоящее описание в другом аспекте далее относится к способам в соответствии с настоящим описанием, где антиген нагружен на молекулы МНС I или II класса, экспрессированные на поверхности подходящей антигенпрезентирующей клетки или искусственной антигенпрезентирующей клетки, при контактировании достаточного количества антигена с антигенпрезентирующей клеткой, или же антиген нагружен на тетрамеры МНС I или II класса путем тетрамеризации комплексов антиген-мономер МНС I или II класса.

Альфа- и бета-цепи альфа-/бета-ТКР и гамма- и дельта-цепи гамма-/дельта-ТКР, как правило, считаются такими, что каждая из них имеет два "домена", а именно вариабельные и константные домены. Вариабельный домен состоит из последовательно расположенных вариабельного сегмента (V) и соединительного сегмента (J). Вариабельный домен может также включать лидерный сегмент (L). Бета- и дельта-цепи могут также включать сегменты разнообразия (D). Константные домены альфа и бета могут также включать С-терминальные трансмембранные (ТМ) домены, которые заякоривают альфа- и бета-цепи на клеточной мембране.

В отношении гамма-/дельта-ТКР, понятие "гамма вариабельный домен ТКР", используемый в контексте данного изобретения, относится к соединению сегмента гамма V ТКР (TRGV) без лидерного сегмента (L) и сегмента ТКР гамма J (TRGJ), а понятие "константный домен ТКР гамма" относится к внеклеточному сегменту TRGC или С-терминальной усеченной последовательности TRGC. В равной степени понятие "дельта вариабельный домен ТКР" относится к соединению сегмента ТКР дельта V (TRDV) без лидерного сегмента (L) и сегмента ТКР дельта D/J (TRDD/TRDJ), а понятие "константный домен ТКР-дельта" относится к внеклеточному сегменту TRDC или С-терминальной усеченной последовательности.

ТКР по настоящему изобретению предпочтительно связываются с комплексом пептида и молекулы HLA с аффинностью связывания (KD) около 100 мкМ или ниже, около 50 мкМ или ниже, около 25 мкМ или ниже или около 10 мкМ или ниже. Более предпочтительными являются высокоаффинные ТКР с аффинностью связывания, составляющей около 1 мкМ или ниже, около 100 нМ или ниже, около 50 нМ или ниже, около 25 нМ или ниже. Неограничивающие примеры диапазонов предпочтительной аффинности связывания для ТКР по настоящему изобретению включают значения от около 1 до около 10 нМ; от около 10 до около 20 нМ; от около 20 до около 30 нМ; от около 30 до около 40 нМ; от около 40 до около 50 нМ; от около 50 до около 60 нМ; от около 60 до около 70 нМ; от около 70 до около 80 нМ; от около 80 до около 90 нМ и от около 90 до около 100 нМ.

Понятие "специфическое связывание", используемое в связи с понятием ТКР по настоящему изобретению, и его грамматические варианты используются для обозначения ТКР с аффинностью связывания (KD) для комплекса пептида и молекулы HLA 100 мкМ или ниже.

Альфа/бета гетеродимерные ТКР согласно настоящему описанию могут иметь введенную дисульфидную связь между их константными доменами. Предпочтительные ТКР этого вида включают те, что имеют последовательность константного домена TRAC и последовательность константного домена TRBC1 или TRBC2, кроме тех случаев, когда Thr 48 домена TRAC и Ser 57 доменов TRBC1 или TRBC2 замещены остатками цистеина, причем указанные остатки цистеина формируют дисульфидную связь между последовательностью константного домена TRAC и последовательностью константного домена TRBC1 или TRBC2 ТКР.

С введением межцепочечной связи, упомянутой выше, или без нее альфа/бета гетеродимерные ТКР по настоящему изобретению могут иметь последовательность константного домена TRAC и последовательность константного домена TRBC1 или TRBC2, и последовательность константного домена TRAC и последовательность константного домена TRBC1 или TRBC2 ТКР может быть связана встречающейся в природе дисульфидной связью между Cys4 экзона 2 домена TRAC и Cys2 экзона 2 домена TRBC1 или TRBC2.

ТКР по настоящему изобретению могут включать поддающуюся обнаружению метку, выбранную из группы, состоящей из радионуклида, флуорофора и биотина. ТКР по настоящему изобретению могут конъюгированы с терапевтически активным ингредиентом, таким как радионуклид, химиотерапевтическим средством или токсином.

В одном варианте осуществления ТКР по настоящему изобретению, имеющий по меньшей мере одну мутацию альфа-цепи и/или имеющий по меньшей мере одну мутацию бета-цепи, обладает модифицированным гликозилированием в сравнении с ТКР без мутаций.

В одном варианте осуществления ТКР, содержащий по меньшей мере одну мутацию в альфа-цепи ТКР и/или бета-цепи ТКР, имеет аффинность связывания по отношению к и/или полупериод связывания по отношению к комплексу пептида и молекулы HLA, которые по меньшей мере вдвое выше, чем у ТКР, содержащего альфа-цепь ТКР без мутаций и/или бета-цепь ТКР без мутаций. Усиление аффинности опухолеспецифических ТКР, а также ее использование, опирается на существование "окна" с оптимальными показателями аффинности для ТКР. Существование такого окна основано на наблюдениях, что ТКР, специфические для HLA-A2-рестриктированных патогенов, обладают показателями KD, которые, в основном, примерно в 10 раз ниже по сравнению с ТКР, специфическими для HLA-A2-рестриктированных

опухолеассоциированных аутоантигенов. Сейчас известно, хотя опухолевые антигены имеют иммуногенный потенциал, поскольку опухоли возникают из собственных клеток индивида, только мутантные белки или белки с изменениями в трансляционном процессинге будут восприниматься иммунной системой как чужеродные. Антигены, уровень которых повышен или которые экспрессируются в избытке (так называемые аутоантигены), не будут в обязательном порядке вызывать функциональный иммунный ответ против опухоли: Т-клетки, экспрессирующие ТКР, которые являются высоко активными по отношению к данным антигенам, будут подвергаться отрицательному отбору внутри вилочковой железы в процессе, известном как центральная толерантность, что означает, что останутся лишь Т-клетки с низкоаффинными ТКР к аутоантигенам. Поэтому аффинность ТКР или вариантов согласно настоящему описанию по отношению к пептидам в соответствии с настоящим изобретением может быть усилена способами, хорошо известными из уровня техники.

Настоящее описание относится далее к способу идентификации и выделения ТКР в соответствии с настоящим описанием, причем указанный способ включает инкубацию МКПК HLA-A*02-отрицательных здоровых доноров с А2/пептидными мономерами, инкубацию МКПК с тетрамер-фикоэритрином (РЕ) и выделение Т-клеток с высокой авидностью с помощью сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS)-Calibur.

Настоящее описание относится далее к способу идентификации и выделения ТКР в соответствии с настоящим описанием, причем указанный способ включает получение трансгенной мыши с целыми человеческими локусами гена $TCR\alpha\beta$ (1,1 и 0,7 млн. п.н.), Т-клетки которой экспрессируют различные ТКР человека, компенсируя недостаток ТКР у мыши, иммунизацию мыши пептидом, представляющим интерес, инкубацию МКПК, полученных у трансгенной мыши, тетрамер-фикоэритрином (РЕ) и выделение Т-клеток с высокой авидностью с помощью сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS)-Calibur.

В одном аспекте для получения Т-клеток, экспрессирующих ТКР согласно настоящему описанию, нуклеиновые кислоты, кодирующие цепи ТКР-альфа и/или ТКР-бета согласно настоящему описанию, клонируют в векторы экспрессии, такие как гамма-ретровирус или -лентивирус. Рекомбинантные вирусы получают и проводят испытание их функциональности, такой как антигенная специфичность и функциональная авидность. Аликвота конечного продукта затем используется для трансдукции целевой популяции Т-клеток (как правило, очищенных от МКПК пациента), которую культивируют перед инфузией пациенту.

В другом аспекте для получения Т-клеток, экспрессирующих ТКР согласно настоящему описанию, РНК ТКР синтезируют с помощью методик, известных из уровня техники, например, транскрипционные системы *in vitro*. Синтезированные *in vitro* РНК ТКР затем вводят с помощью электропорации в первичные CD8⁺ Т-клетки, полученные у здоровых доноров, в целях повторной экспрессии альфа-и/или бета-цепей опухолеспецифических ТКР.

Для увеличения уровня экспрессии нуклеиновые кислоты, кодирующие ТКР согласно настоящему описанию, могут быть функционально связаны с сильными промоторами, такими как длинные терминальные повторы ретровируса (LTR), цитомегаловируса (CMV), вируса стволовых клеток мыши (MSCV) U3, фосфолипидат-киназой (PGK), β -актином, убиквитином и комбинированным промотором вируса обезьян 40 (SV40)/CD43, фактором элонгации (EF)-1a и промотором вируса некроза селезенки (SFV). В предпочтительном варианте осуществления промотор является гетерологичным по отношению к экспрессируемой нуклеиновой кислоте.

В дополнение к сильным промоторам экспрессионные кассеты ТКР согласно настоящему описанию могут содержать дополнительные элементы, которые могут усиливать экспрессию трансгена, включая центральный полипуриновый тракт (сPPT), который способствует ядерной транслокации лентивирусных конструкций (Follenzi et al., 2000), и пост-транскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (wPRE), который повышает уровень экспрессии трансгена за счет увеличения стабильности РНК (Zufferey et al., 1999).

Альфа- и бета-цепи ТКР по настоящему изобретению могут кодироваться нуклеиновыми кислотами, локализованными в отдельных векторах, или могут кодироваться полинуклеотидами, локализованными в одном и том же векторе.

Для достижения высоких уровней экспрессии ТКР на поверхности требуется транскрипция высоких уровней как цепей ТКР-альфа, так и ТКР-бета, введенного ТКР. Для этого цепи ТКР-альфа и ТКР-бета согласно настоящему описанию могут быть клонированы в бицистронные конструкции в одном векторе, который, как было показано, способен преодолеть данное препятствие. Использование участка внутренней посадки рибосомы вируса (IRES) между цепями ТКР-альфа и ТКР-бета приводит к скоординированной экспрессии обеих цепей, поскольку цепи ТКР-альфа и ТКР-бета образуются из одного транскрипта, который разделяется на два белка во время транскрипции, обеспечивая получение равного молярного соотношения цепей ТКР-альфа и ТКР-бета (Schmitt et al. 2009).

Нуклеиновые кислоты, кодирующие ТКР согласно настоящему описанию, могут быть кодон-оптимизированы для увеличения экспрессии клеткой-хозяином. Избыточность генетического кода по-

звolyет кодирование некоторых аминокислот более чем одним кодоном, однако некоторые конкретные кодоны менее "оптимальны", чем другие, по причине относительной доступности подходящих тРНК, а также других факторов (Gustafsson и соавт., 2004). Как было показано, модификации последовательностей генов ТКР-альфа и ТКР-бета, так чтобы каждая аминокислота кодировалась оптимальным кодоном для экспрессии генов млекопитающих, а также удаление нестабильных мотивов мРНК или криптических сайтов сплайсинга, существенно усиливали экспрессию генов ТКР-альфа и ТКР-бета (Scholten и соавт., 2006).

Кроме того, нарушение комплементарности между введенными и эндогенными цепями ТКР может привести к приобретению специфичности, которая будет представлять значительный риск для аутоиммунитета. Например, формирование смешанных димеров ТКР может снизить число молекул CD3, имеющих в наличии для формирования правильно спаренных комплексов ТКР, и, таким образом, может существенно снизить функциональную avidность клеток, экспрессирующих введенный ТКР (Kuball и соавт., 2007).

Для снижения ошибочного спаривания С-концевой домен введенных цепей ТКР согласно настоящему описанию может быть модифицирован в целях стимуляции межцепочечной аффинности, при этом снижая способность введенных цепей спариваться с эндогенным ТКР. Данные стратегии могут включать замещение С-концевых доменов ТКР-альфа и ТКР-бета-цепей человека их мышинными эквивалентами (С-концевой "муринизированный" домен); получение второй межцепочечной дисульфидной связи в С-концевом домене за счет введения второго остатка цистеина в обе цепи: ТКР-альфа и ТКР-бета введенного ТКР (модификация цистеином); обмен взаимодействующими остатками в С-концевом домене ТКР-альфа и ТКР-бета-цепей ("выступ-во-впадину"); и слияние вариабельных доменов цепей ТКР-альфа и ТКР-бета непосредственно в CD3 ζ (слияние CD3 ζ . (Schmitt et al. 2009)).

В одном варианте осуществления клетка-хозяин генетически модифицирована, чтобы экспрессировать ТКР согласно настоящему описанию. В предпочтительных вариантах осуществления клетка-хозяин является человеческой Т-клеткой или предшественником Т-клетки. В одних вариантах осуществления Т-клетка или предшественник Т-клетки получены у пациента, больного раком. В других вариантах осуществления Т-клетка или предшественник Т-клетки получены у здорового донора. Клетки-хозяева согласно настоящему описанию могут быть аллогенными или аутологичными в отношении пациента, подлежащего лечению. В одном варианте осуществления клетка-хозяин является гамма/дельта Т-клеткой, трансформированной для экспрессии альфа-/бета-ТКР.

"Фармацевтическая композиция" является композицией, подходящей для введения человеку в рамках лечения. Предпочтительно, если фармацевтическая композиция является стерильной и произведена в соответствии с правилами GMP (надлежащей производственной практики).

Фармацевтические композиции включают пептиды как в свободной форме, так и в форме фармацевтически приемлемой соли (см. также выше). Используемое в контексте данного изобретения понятие "фармацевтически приемлемая соль" относится к производным раскрытых пептидов, причем пептид модифицирован путем получения кислых или основных солей вещества. Например, кислые соли получают из свободного основания (как правило, где нейтральная форма лекарственного средства имеет нейтральную группу -NH₂) с применением реакции с подходящей кислотой. Подходящие кислоты для получения кислых солей включают как органические кислоты, например уксусную кислоту, пропионовую кислоту, гликолевую кислоту, пировиноградную кислоту, щавелевую кислоту, яблочную кислоту, малоновую кислоту, янтарную кислоту, малеиновую кислоту, фумаровую кислоту, винную кислоту, лимонную кислоту, бензойную кислоту, коричную кислоту, миндальную кислоту, метансульфоновую кислоту, этансульфоновую кислоту, п-толуолсульфокислоту, салициловую кислоту и подобные, так и неорганические кислоты, например, соляную кислоту, бромистоводородную кислоту, серную кислоту, азотную кислоту, фосфорную кислоту и тому подобные. И наоборот, приготовление основных солей кислотных компонентов, которые могут присутствовать на пептиде, производится при использовании фармацевтически приемлемого основания, такого как гидроксид натрия, гидроксид калия, гидроксид аммония, гидроксид кальция, триметиламин и тому подобных.

В одном особенно предпочтительном варианте осуществления фармацевтические композиции включают пептиды в виде солей уксусной кислоты (ацетаты), трифторацетатов или соляной кислоты (хлориды).

Предпочтительно, если медикамент по настоящему изобретению является иммунотерапевтическим препаратом, таким как вакцина. Она может вводиться непосредственно пациенту, в пораженный орган или системно в/к, в/м, п/к, в/б и в/в или вноситься *ex vivo* в клетки, полученные от пациента, или в человеческую клеточную линию, которые затем могут вводиться пациенту или использоваться *in vitro* для селекции субпопуляции из иммунных клеток, полученных от пациента, которые после этого вновь вводятся пациенту. Если нуклеиновая кислота введена в клетки *in vitro*, то может быть полезно, чтобы клетки были трансфицированными, чтобы совместно экспрессировать иммуностимулирующие цитокины, такие как интерлейкин-2. Пептид может быть, по существу, чистым или в комбинации с иммуностимулирующим адъювантом (см. ниже) или использоваться в комбинации с иммуностимулирующими цитокинами или же вводиться с подходящей системой доставки, например липосомами. Пептид может быть

также конъюгирован с подходящим носителем, таким как гемоцианин фиссуреллы (KLH) или маннан (см. WO 95/18145 и (Longenecker et al., 1993)). Пептид может быть также меченым или может быть слитым белком или гибридной молекулой. Пептиды, последовательность которых дана в настоящем изобретении, как ожидается, стимулируют CD4+ или CD8+ Т-клетки. Тем не менее, стимуляция CD8 Т-клеток более эффективна в присутствии поддержки, предоставляемой CD4 хелперными Т-клетками. Таким образом, для эпитопов МНС I класса, которые стимулируют CD8 Т-клетки, партнеры в слиянии или участки гибридной молекулы надлежащим образом предоставляют эпитопы, которые стимулируют CD4-положительные Т-клетки. CD4- и CD8-стимулирующие эпитопы хорошо известны из уровня техники и включают те, что были идентифицированы в настоящем изобретении.

В одном аспекте вакцина включает по меньшей мере один пептид, имеющий аминокислотную последовательность с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No 288, и по меньшей мере один дополнительный пептид, предпочтительно от двух до 50, более предпочтительно от двух до 25, еще более предпочтительно от двух до 20 и, наиболее предпочтительно два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать или восемнадцать пептидов. Пептид(ы) может(могут) быть получен(ы) из одного или более специфических ТАА и может(могут) связываться с молекулами МНС I класса.

В еще одном аспекте изобретения предлагается нуклеиновая кислота (например, полинуклеотид), кодирующая пептид или вариант пептида по изобретению. Полинуклеотид может быть, например, ДНК, кДНК, ПНК, РНК или их комбинациями, как одно-, так и(или) двухнитевыми; природными или стабилизированными формами полинуклеотидов, такими как, например, полинуклеотиды с фосфоротиоатным остовом, и может содержать или не содержать интроны при условии, что полинуклеотид кодирует пептид. Разумеется, только пептиды, которые содержат встречающиеся в природе аминокислотные остатки, присоединенные встречающимися в природе пептидными связями, могут кодироваться полинуклеотидом. В другом аспекте изобретения предложен вектор экспрессии, способный экспрессировать полипептид в соответствии с изобретением.

Был разработан ряд способов связывания полинуклеотидов, в особенности ДНК, с векторами, например, с помощью комплементарных липких концов. К примеру, к сегменту ДНК могут быть добавлены комплементарные гомополимерные хвосты для встраивания в векторную ДНК. Этот вектор и сегмент ДНК в таком случае соединены водородной связью между комплементарными гомополимерными хвостами, образуя молекулы рекомбинантной ДНК.

Синтетические линкеры, содержащие один или несколько сайтов рестрикции, обеспечивают альтернативный способ присоединения сегмента ДНК к векторам. Синтетические линкеры, содержащие ряд сайтов распознавания рестрикционной эндонуклеазы, имеются в продаже в различных источниках, включая International Biotechnologies Inc, Нью-Хейвен, Коннектикут, США.

Желательный способ модификации ДНК, кодирующей полипептид по изобретению, - это использование полимеразной цепной полимеразы, как раскрыто в работе Saiki RK и соавт. (Saiki et al., 1988). Этот способ может быть использован для введения ДНК в подходящий вектор, например, при создании подходящих сайтов рестрикции, или же он может быть использован для модификации ДНК другими пригодными путями, известными из уровня техники. Если используются вирусные векторы, то предпочтительными являются поксвирусные или аденовирусные векторы.

Затем ДНК (или в случае ретровирусных векторов РНК) может экспрессироваться в подходящем хозяине для получения полипептида, включающего пептид или вариант по изобретению. Таким образом, ДНК, кодирующая пептид или вариант по изобретению, может быть использована в соответствии с известными методиками, модифицированными соответствующим образом с учетом раскрытых в данном описании идей, для конструирования вектора экспрессии, который затем используется для трансформации подходящей клетки-хозяина для экспрессии и получения полипептида по изобретению. Такие методики включают те, что раскрыты, например, в патентах США № 4440859, 4530901, 4582800, 4677063, 4678751, 4704362, 4710463, 4757006, 4766075 и 4810648.

ДНК (или в случае ретровирусных векторов - РНК), кодирующая полипептид, представляющий собой соединение по изобретению, может быть присоединена к обширному ряду других последовательностей ДНК для введения в соответствующего хозяина. ДНК-спутник будет зависеть от природы хозяина, способа введения ДНК хозяину и от того, желательно ли поддержание в эпизомальной или интеграционной форме.

Как правило, ДНК вводится в вектор экспрессии, такой как плазмида, с соответствующей ориентацией и правильной рамкой считывания для экспрессии. Если необходимо, то ДНК может быть соединена с соответствующими нуклеотидными последовательностями, обеспечивающими координацию транскрипции и трансляции, распознаваемыми желательным хозяином, хотя такие контрольные элементы обычно имеются в векторе экспрессии. Вектор вводится затем хозяину стандартными способами. Как правило, не все хозяева трансформируются вектором. Поэтому будет необходимо выделить трансформированные клетки-хозяева. Одна из методик отбора включает введение в вектор экспрессии последовательности ДНК с любыми необходимыми элементами контроля, которая кодирует выбранный признак в трансформированной клетке, такой как устойчивость к антибиотикам.

В качестве альтернативы ген для такого выбираемого признака может быть на другом векторе, который используется для совместной трансформации желаемой клетки-хозяина.

Клетки-хозяева, которые были трансформированы рекомбинантной ДНК по изобретению, культивируют затем в течение достаточного времени и при соответствующих условиях, известных специалистам данной области, с учетом раскрытых в данном описании идей, что ведет к экспрессии полипептида, который после этого может быть выделен.

Известно множество систем экспрессии, включающих бактерии (например, *E. coli* и *Bacillus subtilis*), дрожжи (например, *Saccharomyces cerevisiae*), мицелиальные грибы (например, *Aspergillus spec*), растительные клетки, клетки животных и насекомых. Предпочтительно, чтобы система была клетками млекопитающих, такими как клетки CHO, имеющимися в наличии в Американской коллекции типовых культур ATCC.

Типичная клеточная векторная плазмида млекопитающих для конститутивной экспрессии включает промотор CMV или SV40 с подходящим концевым участком поли-А и маркером устойчивости, таким как неомидин. Одним примером является pSVL, имеющимся в наличии в компании Pharmacia, Пискатеуэй, Нью-Джерси, США. Примером индуцируемого вектора экспрессии млекопитающих является pMSG, также имеющийся в наличии в Pharmacia. Пригодными плазмидными векторами дрожжей являются pRS403-406 и pRS413-416, и они, как правило, имеются в наличии у компании Stratagene Cloning Systems, Ла Джолла, Калифорния 92037, США. Плазмиды pRS403, pRS404, pRS405 и pRS406 являются дрожжевыми интегрирующими плазмидами (Ylps) и включают дрожжевые селективируемые маркеры HIS3, TRP1, LEU2 и URA3. Плазмиды pRS413-416 являются дрожжевыми плазмидами с центромерами (Ycp). Основанные на промоторе CMV векторы (например, компании Sigma-Aldrich) обеспечивают кратковременную или устойчивую экспрессию, цитоплазмическую экспрессию или секрецию и N-терминальную или C-терминальную маркировку в различных комбинациях FLAG, 3xFLAG, c-мус или MAT. Данные слитые белки позволяют проводить выявление, очистку и анализ рекомбинантного белка. Слияния с двойной меткой обеспечивают гибкость при выявлении.

Сильный регуляторный участок промотора цитомегаловируса человека (CMV) повышает уровни конститутивной экспрессии белка, достигающие 1 мг/л в клетках COS. Для менее активных клеточных линий белковые уровни обычно составляют ~0,1 мг/л. Присутствие точки начала репликации SV40 будет приводить к высоким уровням репликации ДНК в перmissive клетках COS. Векторы CMV, например, могут содержать точку начала репликации pMB1 (производное pBR322) в бактериальных клетках, ген бета-лактамазы для отбора устойчивости к ампициллину у бактерий, polyA гормона роста человека, и точку начала репликации f1. Векторы, содержащие лидерную последовательность препротрипсина (PPT), могут направлять секрецию слитых белков FLAG в культуральной среде для очистки с использованием антител к FLAG, смол и планшетов. Другие векторы и системы экспрессии для применения с различными клетками-хозяевами хорошо известны из уровня техники.

В другом предпочтительном варианте осуществления кодируются два или более пептида или варианта пептидов по изобретению и, таким образом, они экспрессируются последовательно (как в случае структуры типа "бусины на нити"). В этих целях пептиды или варианты пептидов могут быть соединены или слиты воедино с помощью фрагментов линкерных аминокислот, таких как, например, LLLLLL, или же могут быть соединены без какого(их)-либо дополнительного(ых) пептида(ов) между ними. Эти структуры могут быть также использованы в противораковой терапии и возможно индуцировать иммунные ответы с участием как молекул МНС I, так и МНС II класса.

Настоящее изобретение относится также к клетке-хозяину, трансформированной с помощью полинуклеотидной векторной конструкции по настоящему изобретению. Клетка-хозяин может быть как прокариотической, так и эукариотической. Бактериальные клетки могут быть, предпочтительно, прокариотическими клетками-хозяевами при некоторых условиях и обычно являются штаммом *E. coli*, таким как, например, *E. coli* штамма DH5, имеющимся в наличии в Bethesda Research Laboratories Inc., Бетесда, Мэриленд, США, и RR1, имеющимся в наличии в Американской коллекции типовых культур ("American Type Culture Collection" (ATCC), Роквил, Мэриленд, США (№ ATCC 31343). Предпочтительные эукариотические клетки-хозяева включают дрожжи, клетки насекомых и млекопитающих, предпочтительно клетки позвоночных, таких как линии фибробластных клеток и клеток толстой кишки таких видов как мышь, крыса, обезьяна или человек. Дрожжевые клетки-хозяева включают YPH499, YPH500 и YPH501, которые, как правило, имеются в наличии в Stratagene Cloning Systems, Ла Джолла, Калифорния 92037, США. Предпочтительные клетки-хозяева млекопитающих включают клетки яичника китайского хомяка (CHO), имеющиеся в наличии в ATCC как CCL61, эмбриональные клетки швейцарской мыши линии NIH/3T3, имеющиеся в наличии в ATCC как CRL 1658, клетки COS-1 из почек обезьяны, имеющиеся в наличии в ATCC как CRL 1650, и клетки 293, являющиеся эмбриональными клетками почек эмбрионов человека. Предпочтительными клетками насекомых являются клетки Sf9, которые могут трансфицироваться с помощью бакуловирусных векторов экспрессии. Обзор в отношении выбора подходящих клеток-хозяев для экспрессии представлен, например, в учебном пособии авторов Paulina Balbás и Argelia Lorence "Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols", часть первая, второе издание, ISBN 978-1-58829-262-9, и другой литературе, известной специалисту данной области.

Трансформация соответствующих клеток-хозяев с помощью ДНК-конструкции по настоящему изобретению производится при помощи хорошо известных способов, которые обычно зависят от типа используемого вектора. Относительно трансформации прокариотических клеток-хозяев см., например, работу Cohen и соавт. (Cohen et al., 1972) и (Green and Sambrook, 2012). Трансформация дрожжевых клеток описывается в работе Sherman и соавт. (Sherman et al., 1986). Также подходит метод Бигса (Beggs) (Beggs, 1978). Что касается клеток позвоночных, то подходящие для трансфекции таких клеток реагенты, например, фосфат кальция и DEAE-декстран или липосомальные составы, имеются в наличии в Strata-gene Cloning Systems или Life Technologies Inc., Гейтерсберг, Мэриленд 20877, США. Электропорация также подходит для трансформации и(или) трансфекции клеток и хорошо известна из уровня техники для трансформации дрожжевых клеток, бактериальных клеток, клеток насекомых и клеток позвоночных.

Успешно трансформированные клетки, т.е. клетки, которые содержат конструкцию ДНК по настоящему изобретению, могут быть идентифицированы хорошо известными способами, такими как ПЦР. Альтернативно наличие белка в супернатанте может быть выявлено с применением антител.

Следует понимать, что некоторые клетки-хозяева по изобретению подходят для получения пептидов по изобретению, например, бактериальные, дрожжевые клетки и клетки насекомых. Тем не менее, в конкретных терапевтических методах могут использоваться другие клетки-хозяева. Например, антиген-презентирующие клетки, такие как дендритные клетки, могут с пользой быть использованы для экспрессии пептидов по изобретению так, что их можно будет нагружать на подходящие молекулы МНС. Таким образом, в настоящем изобретении предложена клетка-хозяин, включающая нуклеиновую кислоту или вектор экспрессии в соответствии с изобретением.

В предпочтительном варианте осуществления клетка-хозяин является антигенпрезентирующей клеткой, в частности, дендритной клеткой или антигенпрезентирующей клеткой. АПК, нагруженные рекомбинантным слитым белком, содержащим простатическую кислотную фосфатазу (PAP), были одобрены Управлением по контролю за продуктами питания и лекарственными средствами США (FDA) 29 апреля 2010 г. для применения при лечении метастатического HRPС (гормон-рефрактерного рака предстательной железы), протекающего бессимптомно или с минимально выраженными симптомами (сипулейсел-Т) (Rini et al., 2006; Small et al., 2006).

В другом аспекте изобретения предложен способ получения пептида или его варианта, причем способ включает культивацию клетки-хозяина и выделение пептида из клетки-хозяина или его культуральной среды.

В другом варианте осуществления пептид, нуклеиновая кислота или вектор экспрессии по изобретению применяются в медицине. Например, пептид или его вариант может приготавливаться для внутривенного (в/в) введения, подкожного (п/к) введения, внутрикожного (в/к) введения, внутрибрюшинного (в/б) введения, внутримышечного (в/м) введения. Предпочтительные способы введения пептидов включают п/к, в/к, в/б, в/м и в/в. Предпочтительные способы введения ДНК включают в/к, в/м, п/к, в/б и в/в. Вводятся могут, к примеру, дозы от 50 мкг до 1,5 мг, предпочтительно от 125 мкг до 500 мкг пептида или ДНК, в зависимости от соответствующего пептида или ДНК. Дозировка в данном диапазоне успешно использовалась в предыдущих клинических исследованиях (Walter et al., 2012).

Полинуклеотид, применяемый в активной вакцинации, может быть, по существу, чистым или содержаться в подходящем векторе или системе доставки. Нуклеиновая кислота может быть ДНК, кДНК, ПНК, РНК или их комбинацией.

Методы конструирования и введения такой нуклеиновой кислоты хорошо известны из уровня техники. Обзор представлен, например, в работе Teufel и соавт. (Teufel et al., 2005). Полинуклеотидные вакцины просто получить, однако механизм действия этих векторов по индуцированию иммунного ответа понятен не полностью. Подходящие векторы и системы доставки включают вирусные ДНК и(или) РНК, такие как системы, которые основаны на аденовирусе, вирусе осповакцины, ретровирусах, вирусе герпеса, аденоассоциированном вирусе или гибридах, содержащих элементы более чем одного вируса. Невирусные системы доставки включают катионные липиды и катионные полимеры и хорошо известны из уровня техники в области доставки ДНК. Также может быть использована физическая доставка, такая как посредством "генного пистолета". Пептид или пептиды, кодируемые нуклеиновой кислотой, могут быть слитым белком, например, с эпитопом, который стимулирует Т-клетки против соответствующего противоположного определяющего комплементарность участка CDR, как описывается выше.

Медикамент по изобретению может также включать один или более адъювантов. Адъюванты - это вещества, которые неспецифически усиливают или потенцируют иммунный ответ (например, иммунные ответы, опосредованные CD8-положительными Т-клетками или хелперными Т-клетками (ТН) на антиген, и могут, таким образом, рассматриваться как полезные в медикаменте по настоящему изобретению. Подходящие адъюванты включают, но без ограничения, 1018 ISS, соли алюминия, AMPLIVAX®, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, СуаА, dSLIM, флагеллин или лиганды TLR5, полученные из флагеллина, лиганд FLT3, ГМ-КСФ, IC30, IC31, имиквимод (ALDARA®), резимиквимод, ImuFact IMP321, интерлейкины, такие как ИЛ-2, ИЛ-13, ИЛ-21, интерферон-альфа или бета или их пегилированные производные, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, иммуностимулирующие комплексы ISCOM, JuvImmune®, LipoVac, MALP2,

MF59, монофосфорил липид А, Монтанид IMS 1312, Монтанид ISA 206, Монтанид ISA 50V, Монтанид ISA-51, эмульсии "вода в масле" и "масло в воде", ОК-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, векторную систему RepTel®, основанные на поли-(лактид когликолиде) [PLG] и декстране микрочастицы, талактоферрин SRL172, виросомы и другие вирусоподобные частицы, YF-17D, VEGF trap, R848, Бета-глюкан, Pam3Cys, стимулон Aquila QS21, который получают из сапонины, микобактериальные экстракты и синтетические имитаторы бактериальных клеточных стенок и другие запатентованные адъюванты, такие как Detox компании Ribi, Quil или Superfos. Предпочтительными адъювантами являются такие как адъювант Фрейнда или ГМ-КСФ. Несколько иммунологических адъювантов (например, MF59), специфических для дендритных клеток, и их получение были описаны ранее (Allison and Krummel, 1995). Также могут использоваться цитокины. Несколько цитокинов были непосредственно соотнесены с влиянием на миграцию дендритных клеток к лимфоидным тканям (например, TNF-), ускоряя созревание дендритных клеток до эффективных, презентующих антиген Т-лимфоцитам, клеток (например, ГМ-КСФ, ИЛ-1 и ИЛ-4) (патент США № 5849589, специально включенный сюда в полном объеме путем ссылки) и действуя как иммуноадъюванты (например, ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-23, ИЛ-7, ИНФ-альфа, ИНФ-бета) (Gabrilovich et al., 1996).

Об иммуностимулирующих олигонуклеотидах CpG также сообщалось, что они усиливают эффекты адъювантов в составе вакцин. Не желая быть связанными соответствием какой-либо конкретной теории, авторы полагают, что CpG-олигонуклеотиды при активации врожденной (не приобретенной) иммунной системы действуют с помощью Toll-подобных рецепторов (TLR), в основном, TLR9. Вызванная CpG активация TLR9 усиливает антиген-специфичные гуморальные и клеточные ответы на широкий спектр антигенов, включая пептидные или белковые антигены, живые или убитые вирусы, вакцины из дендритных клеток, аутологичные клеточные вакцины и полисахаридные конъюгаты как в профилактических, так и терапевтических вакцинах. Более важно то, что улучшается созревание и дифференциация дендритных клеток, приводя к повышенной активации клеток типа TH1 и интенсивной выработке цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) даже при отсутствии помощи со стороны CD4 Т-клеток. Активация TH1, вызванная стимуляцией TLR9, сохраняется даже в присутствии вакцинных адъювантов, таких как квасцы или неполный адъювант Фрейнда (IFA), которые обычно способствуют активации TH2. CpG-олигонуклеотиды проявляют даже большую адъювантную активность, если они входят в состав или вводятся в организм вместе с другими адъювантами или в таких составах как микрочастицы, наночастицы, липидные эмульсии или в подобных составах, которые в особенности необходимы для инициации сильного ответа, если антиген относительно слаб. Они также ускоряют иммунную реакцию и позволяют снизить дозы антигена приблизительно на два порядка в сравнении с ответами антитела на полную дозу вакцины без CpG, что наблюдалось в некоторых экспериментах (Krieg, 2006). В патенте США № 6406705 B1 описывается комбинированное применение CpG-олигонуклеотидов, адъювантов, не включающих нуклеиновые кислоты, и антигена для вызывания антиген-специфического иммунного ответа. Антагонистом CpG TLR9 является dSLIM (иммуномодулятор со структурой типа двуцепочечный стебель-петля) компании Mologen (Берлин, Германия), который является предпочтительным компонентом фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Также могут быть использованы другие молекулы, связывающиеся с TLR, такие как TLR 7, TLR 8 и (или) TLR 9, связывающиеся с РНК.

Другие примеры пригодных к использованию адъювантов включают, но без ограничения, химически модифицированные CpG (например, CpR, Idera), аналоги dsPHK, такие как поли-(I:C) и их производные (например, AmpliGen®, Hiltonol®, поли-(ICLC), поли(IC-R), поли(I:C12U), бактериальные ДНК или РНК, отличные от CpG, а также иммуноактивные малые молекулы и антитела, такие как циклофосфамид, сунитиниб, бевацизумаб®, целебрекс, NCX-4016, силденафил, тадалафил, варденафил, сорафениб, темозоломид, темсиrolimus, XL-999, CP-547632, пазопаниб, VEGF Trap, ZD2171, AZD2171, анти-CTLA4, другие антитела, нацеленные на основные структуры иммунной системы (например, антитела к CD40, TGF-бета, рецептору TNF-альфа) и SC58175, которые могут действовать терапевтически и (или) как адъюванты. Количества и концентрации адъювантов и добавок, пригодных для использования в контексте настоящего изобретения, могут быть легко определены опытным специалистом без проведения излишних экспериментов.

Предпочтительными адъювантами являются анти-CD40, имиквимод, резиквимод, ГМ-КСФ, циклофосфамид, сунитиниб, бевацизумаб, интерферон-альфа, CpG олигонуклеотиды и их производные, поли-(I:C) и ее производные, РНК, силденафил и составы из твердых микрочастиц с PLG или виросомы.

В предпочтительном варианте осуществления фармацевтической композиции в соответствии с изобретением адъювант выбран из группы, состоящей из колониестимулирующих факторов, таких как гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ, сарграмостим), циклофосфамид, имиквимод, резиквимод и интерферон-альфа.

В предпочтительном варианте осуществления фармацевтической композиции в соответствии с изобретением адъювант выбран из группы, состоящей из колониестимулирующих факторов, таких как гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ, сарграмостим), циклофосфамид, имиквимод и резиквимод. В предпочтительном варианте осуществления фармацевтической компо-

зии в соответствии с изобретением адъювантом является циклофосфамид, имиквимод или резиквимод. Еще более предпочтительными адъювантами являются монтанид IMS 1312, монтанид ISA 206, монтанид ISA 50V, монтанид ISA-51, поли-ICLC (Hiltonol®) и моноклональные антитела к CD40 или их комбинации.

Эта композиция используется для парентерального введения, такого как подкожное, внутривенное, внутримышечное или для перорального введения. Для этого пептиды и - факультативно - другие молекулы растворяют или суспендируют в фармацевтически приемлемом, предпочтительно водном, носителе. Помимо того, композиция может содержать вспомогательные вещества, такие как буферы, связующие агенты, балластные вещества, разбавители, ароматизаторы, смазочные вещества и т.д. Пептиды могут быть также введены вместе с иммуностимулирующими агентами, такими как цитокины. Обширный список вспомогательных веществ, которые могут быть использованы в такой композиции, может быть взят, например, из работы A. Kibbe, "Handbook of Pharmaceutical Excipients" (Kibbe, 2000). Композиция может использоваться для предупреждения, профилактики и/или лечения аденоматозных или раковых заболеваний. Примеры фармацевтических композиций могут быть взяты, например, из EP 2112253.

Важно понимать, что иммунный ответ, вызванный вакциной в соответствии с изобретением, направлен на раковые клетки на различных стадиях клеточного цикла и различных стадиях развития опухоли. Кроме того, атака направлена на различные сигнальные пути, ассоциированные с раковым заболеванием. Это является преимуществом в сравнении с вакцинами, направленными только на одну или немногие мишени, что может привести к тому, что опухоль легко приспособится к такой атаке (ускользание опухоли). Кроме того, не все отдельные опухоли имеют одинаковые паттерны экспрессии антигенов. Поэтому комбинация нескольких опухолеассоциированных пептидов гарантирует, что на каждой отдельной опухоли имеются по меньшей мере некоторые из этих мишеней. Композиция разработана исходя из того, что, как ожидается, каждая опухоль экспрессирует несколько антигенов и охватывает несколько независимых сигнальных путей, необходимых для роста и сохранения опухоли. Таким образом, вакцина в виде "готовой к применению" может быть легко использована для более крупной популяции пациентов. Это означает, что предварительный отбор пациентов для лечения вакциной может быть ограничен HLA-типированием, не требуя никакого дополнительного анализа биомаркеров экспрессии антигена, однако при этом остается гарантия одновременного воздействия на несколько мишеней в виде индуцированного иммунного ответа, что важно для эффективности (Banchereau et al., 2001; Walter et al., 2012).

В контексте настоящего описания понятие "каркас" относится к молекуле, которая специфически связывается с (например, антигенной) детерминантой. В одном варианте осуществления каркас способен направлять единицу, к которой он прикреплен (например, (второй) антигенсвязывающий элемент) к сайту-мишени, например, к конкретному виду опухолевых клеток или стромы опухоли, несущих антигенную детерминанту (например, комплекс пептида с МНС в соответствии с настоящей патентной заявкой). В другом варианте осуществления каркас способен активировать пути передачи сигналов за счет его антигена-мишени, например, антигена комплекса Т-клеточного рецептора. Каркасы включают, но без ограничения, антитела и их фрагменты, антигенсвязывающие домены антитела, включающие переменный участок тяжелой цепи антитела и переменный участок легкой цепи антитела, связывающие белки, включающие по меньшей мере один мотив анкиринового повтора и однодоменные антигенсвязывающие (SDAB) молекулы, аптамеры, (растворимые) ТКР и (модифицированные) клетки, такие как аллогенные или аутологичные Т-клетки. Чтобы оценить, является ли молекула каркасом, связывающимся с мишенью, может быть проведен анализ связывания.

"Специфическое" связывание обозначает, что каркас связывается с представляющим интерес комплексом пептида с МНС лучше, чем с другими встречающимися в природе комплексами пептида с МНС, в такой степени, что каркас, снабженный активной молекулой, способной уничтожить клетку, несущую специфическую мишень, не способен уничтожить другую клетку без специфической мишени, но презентующую другой(ие) комплекс(ы) пептида с МНС. Связывание с другими комплексами пептида с МНС не играет роли, если пептид перекрестно реагирующего комплекса пептида с МНС не является встречающимся в природе, т.е. не образован из человеческого HLA-пептидома. Испытания для оценки потенциала уничтожения клетки-мишени хорошо известны из уровня техники. Они должны проводиться с использованием клеток-мишеней (первичные клетки или клеточные линии) с неизменной презентацией комплексов пептида с МНС или клеток, нагруженных пептидами, таким образом, что будет достигаться уровень встречающихся в природе комплексов пептида с МНС.

Каждый каркас может включать метку, которая обеспечивает возможность обнаружения связанного каркаса за счет определения наличия или отсутствия сигнала, подаваемого меткой. Например, каркас может быть помечен флуоресцентным красителем или любой другой применимой маркерной молекулы клетки. Такие маркерные молекулы хорошо известны из области техники. Например, флуоресцентное мечение, например, с помощью флуоресцентного красителя, может обеспечивать визуализацию связанного аптамера посредством флуоресцентной или лазерной сканирующей микроскопии или проточной цитометрии.

Каждый каркас может быть конъюгирован со второй активной молекулой, такой как, например,

ИЛ-21, антитело к CD3 и антитело к CD28.

Для получения дальнейшей информации о полипептидных каркасах см., например, раздел уровня техники патентной заявки WO 2014/071978 A1 и цитируемую в ней литературу.

Настоящее изобретение далее относится к аптамерам. Аптамеры (см., например, заявку WO 2014/191359 и цитируемую в ней литературу) - это короткие одноцепочечные молекулы нуклеиновых кислот, которые могут сворачиваться в определенные трехмерные структуры и распознавать специфические структуры-мишени. Оказалось, что они представляют собой подходящую альтернативу для разработки таргетной терапии. Как было продемонстрировано, аптамеры селективно связываются с различными сложными мишенями с высокой аффинностью и специфичностью.

Аптамеры, распознающие молекулы, которые находятся на поверхности клеток, были идентифицированы в последнее десятилетие и предоставляют возможность для разработки диагностических и терапевтических подходов. Так как было продемонстрировано, что аптамеры практически не обладают токсичностью и иммуногенностью, они являются многообещающими кандидатами для биомедицинского применения. Действительно, аптамеры, например, аптамеры, распознающие простатический специфический мембранный антиген, были успешно задействованы в таргетной терапии и продемонстрировали функциональность в моделях с ксенотрансплантатами *in vivo*. Кроме того, были идентифицированы аптамеры, распознающие конкретные опухолевые линии.

Могут быть отобраны ДНК-аптамеры, проявляющие широкий спектр свойств по распознаванию различных раковых клеток, и, в частности, клеток, образованных из солидных опухолей, тогда как неопухолегенные и первичные здоровые клетки не распознаются. Если идентифицированные аптамеры распознают не только конкретный опухолевый подтип, но и взаимодействуют с различными опухолями, это делает возможным применение аптамеров в качестве так называемых диагностических и терапевтических средств широкого спектра действия.

Более того, исследование поведения по связыванию с клетками с помощью проточной цитометрии показало, что аптамеры проявляли очень хорошую кажущуюся аффинность, которая выражалась на наномолярном уровне.

Аптамеры пригодны для диагностических и терапевтических целей. Кроме того, как могло быть продемонстрировано, некоторые аптамеры захватываются опухолевыми клетками и, таким образом, могут действовать в качестве молекулярных носителей для направленной доставки противораковых средств, таких как мРНК, в опухолевые клетки.

Могут быть отобраны аптамеры к сложным мишеням, таким как клетки и ткани и комплексы пептидов, включающих, предпочтительно состоящих из последовательности в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 288, в соответствии с представленным изобретением с молекулой МНС, используя метод cell-SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment - систематическая эволюция лигандов при экспоненциальном обогащении).

Пептиды по настоящему изобретению могут использоваться для получения и разработки специфических антител к комплексам МНС/пептид. Они могут быть использованы в терапии, нацеливающей токсины или радиоактивные вещества на пораженную ткань. Другим видом использования данных антител может быть "нацеливание" радионуклидов на пораженную ткань в целях визуализации, такой как ПЭТ (позитронно-эмиссионная томография). Это может помочь в обнаружении небольших метастазов или в определении размера и точной локализации пораженных тканей.

Таким образом, в другом аспекте изобретения предложен способ получения рекомбинантного антитела, специфически связывающегося с главным комплексом гистосовместимости человека (МНС) I или II класса в комплексе с рестриктированным по HLA антигеном, причем способ включает: иммунизацию генетически модифицированного, не являющегося человеком млекопитающего, содержащего клетки, экспрессирующие молекулы указанного главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) I или II класса с растворимой формой молекулы МНС I или II класса в комплексе с указанным рестриктированным по HLA антигеном; выделение молекул мРНК из продуцирующих антитела клеток указанного не являющегося человеком млекопитающего; создание библиотеки фагового отображения, содержащей фаги, экспонирующие белковые молекулы, закодированные указанными молекулами мРНК; и выделение по меньшей мере одного фага из указанной библиотеки фагового отображения, причем указанный по меньшей мере один фаг экспонирует на поверхности указанное антитело, специфически связывающееся с указанным главным комплексом гистосовместимости человека (МНС) I или II класса в комплексе с указанным рестриктированным по HLA антигеном.

В другом аспекте изобретения предложено антитело, которое специфически связывается с главным комплексом гистосовместимости человека (МНС) I или II класса в комплексе с рестриктированным по HLA антигеном, где антитело предпочтительно является поликлональным антителом, моноклональным антителом, биспецифичным антителом и(или) химерным антителом.

Соответствующие способы получения таких антител и одноцепочечных главных комплексов гистосовместимости I класса, в равной степени как и другие инструменты для получения данных антител, раскрыты в патентных заявках WO 03/068201, WO 2004/084798, WO 01/72768, WO 03/070752 и в опубликованных работах (Cohen et al., 2003a; Cohen et al., 2003b; Denkberg et al., 2003), которые все в целях на-

стоящего изобретения в явном виде включены во всей полноте путем ссылки.

Предпочтительно, если антитело связывается с аффинностью связывания ниже 20 наномолей, предпочтительно ниже 10 наномолей, с комплексом, который также называется "специфическим" в контексте настоящего изобретения.

Настоящее изобретение относится к пептиду, включающему последовательность, которая выбирается из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 288 или их вариант, который по меньшей мере на 88% гомологичен (предпочтительно, если он идентичен) последовательности с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 288, или их варианту, который индуцирует Т-клеточную перекрестную реакцию с указанным пептидом, где указанный пептид не является базовым полипептидом полной длины.

Настоящее изобретение далее относится к пептиду, включающему последовательность, которая выбирается из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 288 или их вариант, который по меньшей мере на 88% гомологичен (предпочтительно, если он идентичен) SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 288, где указанный пептид или его вариант имеет общую длину от 8 до 100, предпочтительно от 8 до 30 и наиболее предпочтительно от 8 до 14 аминокислот.

Настоящее изобретение далее относится к пептидам в соответствии с изобретением, способным связываться с молекулой главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) I или II класса.

Настоящее изобретение далее относится к пептидам в соответствии с изобретением, где пептид состоит или состоит по существу из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 288.

Настоящее изобретение далее относится к пептидам в соответствии с изобретением, где пептид модифицирован (химическим способом) и(или) включает непептидные связи.

Настоящее изобретение далее относится к пептидам в соответствии с изобретением, где пептид является частью слитого белка, в частности включающим N-терминальные аминокислоты HLA-DR антиген-ассоциированной инвариантной цепи (Ii), или где пептид слит с антителом (или слит с последовательностью антитела), например, таким антителом, которое является специфичным для дендритных клеток.

Настоящее изобретение далее относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей пептиды в соответствии с изобретением, при условии, что пептид не является полностью (целиком) человеческим белком.

Настоящее изобретение далее относится к нуклеиновой кислоте в соответствии с изобретением, которая является ДНК, кДНК, ПНК, РНК или их комбинациями.

Настоящее изобретение далее относится к вектору экспрессии, способному экспрессировать нуклеиновую кислоту в соответствии с настоящим изобретением.

Настоящее изобретение далее относится к пептиду в соответствии с настоящим изобретением, к нуклеиновой кислоте в соответствии с настоящим изобретением или к вектору экспрессии в соответствии с настоящим изобретением для применения в медицине, в частности, в лечении ГЧК, КРК, ГБ, РЖ, рака пищевода, НМРЛ, РПЖ, ПКК, ДГПрЖ/РПрЖ, РЯ, ККМ, меланомы, рака молочной железы, МРЛ, НХЛ, ОМЛ, РЖП, ХК, РМП, РЭМ или ХЛЛ.

Настоящее изобретение далее относится к клетке-хозяину, включающей нуклеиновую кислоту в соответствии с изобретением или вектор экспрессии в соответствии с изобретением.

Настоящее изобретение далее относится к клетке-хозяину в соответствии с настоящим изобретением, которая является антигенпрезентирующей клеткой, предпочтительно - дендритной клеткой.

Настоящее изобретение далее относится к способу получения пептида в соответствии с настоящим изобретением, причем указанный способ включает культивацию клетки-хозяина в соответствии с настоящим изобретением и выделение пептида из указанной клетки-хозяина или его культуральной среды.

Настоящее изобретение далее относится к способу в соответствии с настоящим изобретением, где антиген нагружен на молекулы МНС I или II класса, экспрессированные на поверхности подходящей антигенпрезентирующей клетки, при контактировании достаточного количества антигена с антигенпрезентирующей клеткой.

Настоящее изобретение далее относится к способу в соответствии с изобретением, где антигенпрезентирующая клетка включает вектор экспрессии, способный экспрессировать указанный пептид, содержащий последовательность с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 288 или указанную вариантную аминокислотную последовательность.

Настоящее изобретение далее относится к активированным Т-клеткам, полученным способом в соответствии с настоящим изобретением, где указанные Т-клетки селективно распознают клетку, которая аберрантно экспрессирует полипептид, включающий аминокислотную последовательность в соответствии с настоящим изобретением, причем способ включает введение пациенту эф-фективного числа Т-клеток в соответствии с настоящим изобретением.

Настоящее изобретение далее относится к способу уничтожения клеток-мишеней у пациента, чьи клетки-мишени аберрантно экспрессируют полипептид, включающий любую аминокислотную последовательность в соответствии с настоящим изобретением, причем способ включает введение пациенту эф-фективного числа Т-клеток в соответствии с настоящим изобретением.

Настоящее изобретение далее относится к применению любого описанного пептида, нуклеиновой

кислоты в соответствии с настоящим изобретением, вектора экспрессии в соответствии с настоящим изобретением, клетки в соответствии с настоящим изобретением или активированного цитотоксического Т-лимфоцита в соответствии с настоящим изобретением в качестве медикамента или в производстве медикамента. Настоящее изобретение далее относится к способу применения в соответствии с настоящим изобретением, где медикамент проявляет противораковую активность.

Настоящее изобретение далее относится к способу применения в соответствии с изобретением, где медикамент является вакциной. Настоящее изобретение далее относится к способу применения в соответствии с изобретением, где медикамент проявляет противораковую активность.

Настоящее изобретение далее относится к применению в соответствии с изобретением, где указанные раковые клетки являются клетками ГКК, КРК, ГБ, РЖ, рака пищевода, НМРЛ, РПЖ, ПКК, ДГПрЖ/РПрЖ, РЯ, ККМ, меланомы, рака молочной железы, МРЛ, НХЛ, ОМЛ, РЖП, ХК, РМП, РЭМ или ХЛЛ.

Настоящее изобретение далее относится к конкретным белкам-маркерам и биомаркерам, основанным на пептидах в соответствии с настоящим изобретением, называемых в настоящем контексте "мишенями", которые могут применяться в постановке диагноза и/или составлении прогноза для ГКК, КРК, ГБ, РЖ, рака пищевода, НМРЛ, РПЖ, ПКК, ДГПрЖ/РПрЖ, РЯ, ККМ, меланомы, рака молочной железы, МРЛ, НХЛ, ОМЛ, РЖП, ХК, РМП, РЭМ или ХЛЛ. Настоящее изобретение относится также к применению этих новых мишеней для лечения рака.

Понятие "антитело" или "антитела" используется в контексте данного изобретения в широком смысле и включает как поликлональные, так и моноклональные антитела. В дополнение к интактным или "полноразмерным" молекулам иммуноглобулина в понятие "антитела" включены также фрагменты (например, участки CDR, фрагменты Fv, Fab и Fc) или полимеры таких молекул иммуноглобулина и гуманизированные версии молекул иммуноглобулина, при условии, что они проявляют любое из желаемых свойств (например, специфически связываются с полипептидным маркером ГКК, КРК, ГБ, РЖ, рака пищевода, НМРЛ, РПЖ, ПКК, ДГПрЖ/РПрЖ, РЯ, ККМ, меланомы, рака молочной железы, МРЛ, НХЛ, ОМЛ, РЖП, ХК, РМП, РЭМ или ХЛЛ, доставляют токсин к клетке ГКК, КРК, ГБ, РЖ, рака пищевода, НМРЛ, РПЖ, ПКК, ДГПрЖ/РПрЖ, РЯ, ККМ, меланомы, рака молочной железы, МРЛ, НХЛ, ОМЛ, РЖП, ХК, РМП, РЭМ или ХЛЛ, экспрессирующей ген-маркер рака на повышенном уровне и/или ингибируют активность полипептидного маркера ГКК, КРК, ГБ, РЖ, рака пищевода, НМРЛ, РПЖ, ПКК, ДГПрЖ/РПрЖ, РЯ, ККМ, меланомы, рака молочной железы, МРЛ, НХЛ, ОМЛ, РЖП, ХК, РМП, РЭМ или ХЛЛ) в соответствии с настоящим изобретением.

Если возможно, антитела по изобретению могут быть куплены в коммерческих источниках. Антитела по изобретению могут быть также получены при использовании хорошо известных способов. Специалисту будет понятно, что для генерирования антител по изобретению могут использоваться либо полноразмерные полипептидные маркеры ГКК, КРК, ГБ, РЖ, рака пищевода, НМРЛ, РПЖ, ПКК, ДГПрЖ/РПрЖ, РЯ, ККМ, меланомы, рака молочной железы, МРЛ, НХЛ, ОМЛ, РЖП, ХК, РМП, РЭМ и ХЛЛ полной длины, либо их фрагменты. Полипептид, необходимый для получения антитела по изобретению, может быть частично или полностью очищенным из природного источника или же может быть получен с использованием методики рекомбинантной ДНК.

Например, кДНК, кодирующая пептид в соответствии с настоящим изобретением, такой как пептид с последовательностью с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 288, полипептид или вариант или его фрагмент может быть экспрессирован в прокариотических клетках (например, бактерий) или эукариотических клетках (например, дрожжей, насекомых или клетках млекопитающих), после чего рекомбинантный белок может быть очищен и использован в получении препарата из моноклональных или поликлональных антител, которые специфически связываются с полипептидным маркером ГКК, КРК, ГБ, РЖ, рака пищевода, НМРЛ, РПЖ, ПКК, ДГПрЖ/РПрЖ, РЯ, ККМ, меланомы, рака молочной железы, МРЛ, НХЛ, ОМЛ, РЖП, ХК, РМП, РЭМ и ХЛЛ, использованным для получения антитела по изобретению.

Специалисту данной области будет понятно, что получение двух или более различных наборов моноклональных или поликлональных антител увеличивает вероятность получения антитела со специфичностью и аффинностью, необходимыми для предназначенного для него использования (например, для ELISA, иммуногистохимии, визуализации *in vivo*, терапии на основе иммунотоксина). Антитела испытывают на желаемую для них активность с помощью известных методов в соответствии с целью применения антител (например, ELISA, иммуногистохимия, иммунотерапия и т.д.; для получения дальнейшей информации по генерированию и испытанию антител см., например, Greenfield, 2014 (Greenfield, 2014)). Например, антитела могут быть исследованы с помощью ELISA или метода иммунного блоттинга (Western-blot), иммуногистохимического окрашивания зафиксированных формалином образцов раковых тканей или замороженных тканевых срезов. После первоначального определения их характеристик *in vitro* антитела, предназначенные для терапевтического или диагностического применения *in vivo* исследуют в соответствии с известными клиническими методами анализа.

Понятие "моноклональное антитело" в контексте настоящего изобретения обозначает антитело, полученное из, по существу, гомогенной популяции антител, т.е. отдельные антитела внутри популяции идентичны за исключением возможных естественных мутаций, которые могут быть представлены в не-

больших количествах. Моноклональные антитела в контексте настоящего изобретения специфически включают "химерные" антитела, в которых участок тяжелой и(или) легкой цепи идентичен или гомологичен соответствующим последовательностям антител, полученных из конкретного вида или относящихся к конкретному классу или подклассу антител, в то время как остальная(ые) часть(и) цепи идентична(ы) или гомологична(ы) соответствующим последовательностям антител, полученных из другого вида или относящихся к другому классу или подклассу антител, в равной степени как и фрагментов таких антител, пока они проявляют желаемую антагонистическую активность (Патент США № 4816567, который включен в настоящее описание в полном объеме).

Моноклональные антитела по изобретению могут быть получены при использовании гибридомного метода. В рамках гибридомного метода мышь или другое подходящее животное-хозяин обычно иммунизируется иммунизирующим веществом, чтобы инициировать лимфоциты, которые вырабатывают или способны вырабатывать антитела, которые будут специфически связываться с иммунизирующим веществом. Альтернативно лимфоциты могут быть иммунизированы *in vitro*.

Моноклональные антитела могут быть также получены с помощью технологий рекомбинантных ДНК, таких как описываемые в патенте США № 4816567. ДНК, кодирующая моноклональные антитела по изобретению, может быть легко выделена и секвенирована с помощью стандартных методик (например, при использовании олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи мышинных антител).

In vitro методы также подходят для получения моновалентных антител. Расщепление антител для получения их фрагментов, в особенности Fab-фрагментов, может быть произведено при использовании стандартных методик, известных из уровня техники. К примеру, расщепление может производиться при использовании папаина. Примеры расщепления под воздействием папаина описываются в заявке WO 94/29348 и в патенте США № 4342566. Расщепление антител под воздействием папаина обычно приводит к двум идентичным фрагментам, связывающимся с антигеном и называемым Fab-фрагментами, каждый из которых имеет отдельный антигенсвязывающий сайт и остаточный Fc-фрагмент. В результате обработки пепсином получается фрагмент F(ab')₂ и фрагмент pFc'.

Фрагменты антител, как связанные с другими последовательностями, так и не связанные, могут также включать вставки, делеции, замещения или другие выбранные модификации конкретных участков или аминокислотных остатков при условии, что активность фрагмента незначительно изменена или повреждена по сравнению с немодифицированным антителом или фрагментом антитела. Данные модификации могут внести некоторые дополнительные свойства, такие как добавление/удаление аминокислот, способных к дисульфидному связыванию, увеличение их биологической стойкости, изменение их секреторных характеристик и т.д. В любом случае, фрагмент антитела должен обладать свойством биологической активности, таким как активностью связывания, регуляцией связывания на связывающем домене и т.д. Функциональные или активные участки антитела могут быть идентифицированы при мутагенезе конкретного участка белка с последующей экспрессией и исследованием экспрессированного полипептида. Такие способы полностью очевидны для опытного специалиста данной области и могут включать сайт-специфический мутагенез нуклеиновой кислоты, кодирующей фрагмент антитела.

Антитела по изобретению могут далее включать гуманизированные антитела или человеческие антитела. Гуманизированные формы нечеловеческих (например, мышинных) антител - это химерные иммуноглобулины, иммуноглобулиновые цепи или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab' или другие антигенсвязывающие субпоследовательности антител), которые содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого иммуноглобулина. Гуманизированные антитела включают человеческие иммуноглобулины (антитело-реципиент), в которых остатки из определяющего комплементарность участка (CDR) реципиента замещены остатками из CDR биологических видов, не являющихся человеком (донорское антитело), таких как мыши, крысы или кролики, имеющими желаемую специфичность, аффинность и связывающая способность. В некоторых случаях остатки Fv-каркаса (FR) человеческого иммуноглобулина замещены соответствующими остатками нечеловеческого происхождения. Гуманизированные антитела могут также включать остатки, которые не встречаются ни в антитело-реципиенте, ни в импортированном CDR или каркасных последовательностях. Как правило, гуманизированное антитело будет включать по сути все из по меньшей мере одного и, как правило, двух переменных доменов, в которых все или по существу все участки CDR соответствуют таковым нечеловеческого иммуноглобулина, и все или по сути все из участков FR являются таковыми консенсусной последовательности иммуноглобулина человека. Оптимально, чтобы гуманизированное антитело содержало также по меньшей мере часть константного участка иммуноглобулина (Fc), как правило, человеческого иммуноглобулина.

Способы гуманизации нечеловеческих антител хорошо известны из уровня техники. В целом, гуманизированное антитело имеет один или более аминокислотных остатков, введенный в него из источника, не являющегося человеческим. Такие аминокислотные остатки нечеловеческого происхождения часто называются "импортированными" остатками, которые обычно берутся из "импортированного" переменного домена. Гуманизация может быть по существу произведена посредством замены участков CDR или последовательностей CDR грызунов на соответствующие последовательности человеческого антитела. Соответственно, такие "гуманизированные" антитела являются химерными антителами (патент

США № 4816567), где существенно меньшая часть, чем один интактный человеческий переменный домен была заменена соответствующей последовательностью нечеловеческого вида. На практике гуманизированные антитела являются обычно человеческими антителами, в которых некоторые остатки CDR и, возможно, остатки FR заменены на остатки аналогичных сайтов антител грызунов.

Использоваться могут трансгенные животные (например, мыши), которые способны при иммунизации вырабатывать полный спектр человеческих антител при отсутствии выработки эндогенного иммуноглобулина. Например, было описано, что гомозиготная делеция гена, кодирующего участок присоединения тяжелой цепи антитела у химерных и мутантных мышей зародышевой линии, приводит к полному ингибированию выработки эндогенных антител. Перенос генной матрицы иммуноглобулина клеток зародышевой линии человека в таких мутантных мышей зародышевой линии будет приводить к выработке человеческих антител после антигенной стимуляции. Человеческие антитела могут быть также получены в библиотеках фагового отображения.

Антитела по изобретению предпочтительно вводятся субъекту в фармацевтически приемлемом носителе. Подходящее количество фармацевтически приемлемой соли обычно используется в составе для придания композиции изотоничности. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают физиологический раствор, раствор Рингера и раствор глюкозы. Уровень pH раствора составляет, предпочтительно, от около 5 до около 8 и, более предпочтительно, от около 7 до около 7,5. Кроме того, предлагаются носители, включающие препараты пролонгированного высвобождения, такие как полупроницаемые матрицы твердых гидрофобных полимеров, содержащие антитело, матрицы которых имеют вид профилированных объектов, к примеру, пленки, липосомы или микрочастицы. Для специалиста данной области будет очевидно, что определенные носители могут быть более предпочтительными в зависимости от, например, способа введения и концентрации вводимого антитела.

Антитела могут вводиться субъекту, пациенту или в клетку посредством инъекции (например, внутривенно, внутривенно, подкожно, внутримышечно) или другими способами, такими как вливание, которое гарантирует доставку к кровотоку эффективным образом. Антитела также могут вводиться внутритуморальными или перитуморальными способами, чтобы вызвать местные, а также и системные терапевтические эффекты. Предпочтительными являются местное или внутривенное введение.

Эффективная дозировка и режим введения антител могут быть определены эмпирически, а принятие таковых решений под силу специалисту данной области. Специалистам данной области будет понятно, что дозировка антител, которые должны быть введены, будет варьироваться в зависимости от, например, субъекта, которому будет вводиться антитело, способа введения, конкретного типа используемого антитела и других вводимых медикаментов. Типичная дневная дозировка антитела, используемого отдельно, может варьироваться от около 1 мкг/кг вплоть до 100 мг/кг массы тела или более в день, в зависимости от факторов, упоминаемых выше. После введения антитела, предпочтительно для лечения ГМК, КРК, ГБ, РЖ, рака пищевода, НМРЛ, РПЖ, ПКК, ДГПРЖ/РПРЖ, РЯ, ККМ, меланомы, рака молочной железы, МРЛ, НХЛ, ОМЛ, РЖП, ХК, РМП, РЭМ или ХЛЛ, эффективность терапевтического антитела может быть оценена различными способами, хорошо известными опытному специалисту. Например, размер, количество и(или) распределение рака у субъекта, проходящего лечение, может контролироваться с помощью стандартных методов визуализации опухоли. Введенное в терапевтических целях антитело, которое блокирует рост опухоли, приводит к уменьшению размера и(или) предотвращает развитие новых опухолей в сравнении с течением болезни, которое бы имело место без введения антитела, и является эффективным антителом для лечения рака.

В другом аспекте изобретения предложен способ получения растворимого Т-клеточного рецептора (ТКР), распознающего конкретный комплекс пептида и МНС. Такие растворимые Т-клеточные рецепторы могут быть получены из специфических Т-клеточных клонов, и их аффинность может быть повышена за счет мутагенеза, направленного на определяющие комплементарность участки. Для выбора Т-клеточного рецептора может использоваться фаговое отображение (заявка США 2010/0113300, (Liddy et al., 2012)). В целях стабилизации Т-клеточных рецепторов в процессе фагового отображения и в случае практического применения в качестве лекарственного средства альфа- и бета-цепи могут быть связаны, например, посредством не встречающихся в природе дисульфидных связей, других ковалентных связей (одноцепочечный Т-клеточный рецептор) или с помощью доменов димеризации (Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999). В целях выполнения определенных функций на клетках-мишенях Т-клеточный рецептор может быть связан с токсинами, лекарственными средствами, цитокинами (см., например, заявку США 2013/0115191) и доменами, рекрутирующими эффекторные клетки, такими как анти-CD3 домен, и т.д. Более того, он может быть экспрессирован на Т-клетках, используемых для адоптивного переноса. Дополнительную информацию можно найти в патентных заявках WO 2004/033685 A1 и WO 2004/074322 A1. Комбинация растворимых ТКР описывается в патентной заявке WO 2012/056407 A1. Другие способы получения описаны в патентной заявке WO 2013/057586 A1.

Помимо того, пептиды и(или) ТКР или антитела или другие связывающиеся молекулы настоящего изобретения могут быть использованы для подтверждения диагноза рака, поставленного патоморфологом на основании исследования биоптата.

Антитела или ТКР могут также применяться для диагностики *in vivo*. Как правило, антитело поме-

чают радионуклеотидом (таким как ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^3H , ^{32}P или ^{35}S), так что опухоль может быть локализована с помощью иммуносцинтиграфии. В одном варианте осуществления антитела или их фрагменты связываются с внеклеточными доменами двух или более мишеней белка, выбранного из группы, состоящей из указанных выше белков, при показателе аффинности (K_d) ниже чем 1×10 мкМ.

Антитела для диагностических целей могут помечаться зондами, подходящими для обнаружения различными способами визуализации. Способы обнаружения зондов включают, но без ограничения, флуоресценцию, световую, конфокальную и электронную микроскопию; магнитно-резонансную томографию и спектроскопию; флуороскопию, компьютерную томографию и позитронно-эмиссионную томографию. Подходящие зонды включают, но без ограничения, флуоресцеин, родамин, эозин и другие флуорофоров, радиоизотопы, золото, гадолиний и другие лантаноиды, парамагнитное железо, фтор-18 и другие позитронно-активные радионуклиды. Более того, зонды могут быть би- или мультифункциональными и обнаруживаться более чем одним из приведенных способов. Данные антитела могут быть помечены напрямую или опосредованно указанными зондами. Присоединение зондов к антителам включает ковалентное присоединение зонда, внедрение зонда в антитело и ковалентное присоединение хелатирующего соединения для присоединения зонда, среди других широко признанных методов в данной области. Для иммуногистохимических исследований образцов пораженной ткани может быть свежим или замороженным или может быть залит парафином и зафиксирован таким консервантом как формалин. Зафиксированный или залитый срез приводят в контакт с помеченным первичным антителом и вторичным антителом, где антитело используется для обнаружения экспрессии белков *in situ*.

Другой аспект настоящего изобретения включает способ получения активированных Т-клеток *in vitro*, причем способ включает контактирование Т-клеток *in vitro* с нагруженными антигеном молекулами МНС человека, экспрессированными на поверхности подходящей антигенпрезентирующей клетки на период времени, достаточного для активации антигенспецифическим образом Т-клетки, где антиген является пептидом в соответствии с изобретением. Предпочтительно, если с антигенпрезентирующей клеткой применяется достаточное количество антигена.

Предпочтительно, если в клетке млекопитающих не имеется пептидного транспортера ТАР или имеется его пониженный уровень или пониженная функциональная активность. Подходящие клетки с дефицитом пептидного транспортера ТАР, включают Т2, RMA-S и клетки дрозофилы. ТАР - это транспортер, связанный с процессингом антигена.

Линия человеческих клеток с недостаточностью Т2, на которые загружаются пептиды, имеется в наличии в Американской коллекции типовых культур, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, США под каталожным номером CRL 1992; клеточная линия дрозофилы, линия Schneider 2 имеется в наличии в ATCC под каталожным номером CRL 19863; клеточная линия мыши RMA-S описывается в работе Ljunggren и соавт. (Ljunggren and Kärre, 1985).

Предпочтительно, если до трансфекции указанная клетка-хозяин, по существу, не экспрессирует молекулы МНС I класса. Также предпочтительно, если клетка-стимулятор экспрессирует молекулу, важную для обеспечения сигнала костимуляции для Т-клеток, такую как любая из B7.1, B7.2, ICAM-1 и LFA 3. Последовательности нуклеиновых кислот многочисленных молекул МНС I класса и костимуляторных молекул общедоступны в банках данных GenBank и EMBL.

В случае использования эпитопа МНС I класса в качестве антигена, Т-клетки являются CD8-положительными Т-клетками.

Если антигенпрезентирующая клетка трансфицирована для экспрессии такого эпитопа, то предпочтительно, чтобы клетка включала вектор экспрессии, способный экспрессировать пептид, содержащий SEQ ID № 1 по SEQ ID № 288 или вариант такой аминокислотной последовательности.

Для получения Т-клеток *in vitro* могут быть использованы многие другие способы. Например, для получения ЦТЛ используются аутологичные опухоль-инфильтрующие лимфоциты. Plebanski и соавт. (Plebanski et al., 1995) для получения Т-клеток использовали аутологичные лимфоциты периферической крови (ЛПК). Кроме того, возможно получение аутологичных Т-клеток посредством нагрузки дендритных клеток пептидом или полипептидом или посредством инфицирования рекомбинантным вирусом. Для получения аутологичных Т-клеток также можно использовать В-клетки. Кроме того, для получения аутологичных Т-клеток могут быть использованы макрофаги, нагруженные пептидом или полипептидом или инфицированные рекомбинантным вирусом. S. Walter и соавт. (Walter et al., 2003) описывают прайминг Т-клеток *in vitro* с использованием искусственных антигенпрезентирующих клеток (иАПК), что является также подходящим способом получения Т-клеток против выбранного пептида. В настоящем изобретении иАПК были получены прикреплением предварительно образованных комплексов МНС-пептид к поверхности полистироловых частиц (микрофер) с помощью биохимического способа с биотином-стрептавидином. Данная система допускает точный контроль плотности МНС на иАПК, который позволяет селективно вызвать высоко- или низкоавидные антигенспецифические Т-клеточные ответы с высокой эффективностью в образцах крови. Кроме комплексов МНС-пептид, иАПК должны нести другие белки с костимуляторной активностью, такие как антитела к CD28, прикрепленные к их поверхности. Кроме того, такая основанная на иАПК система часто требует добавления соответствующих растворимых факторов, к примеру, цитокинов, таких как интерлейкин-12.

При получении Т-клеток могут быть также использованы аллогенные клетки, и этот способ подробно описывается в патентной заявке WO 97/26328, включенной сюда путем ссылки. Например, кроме клеток дрозиды и Т2-клеток, для презентации антигенов могут использоваться другие клетки, такие как клетки яичника китайского хомяка (СНО), бакуловирус-инфицированные клетки насекомых, бактерии, дрожжи и инфицированные осповакциной клетки-мишени. Кроме того, могут быть использованы растительные вирусы (см., например, работу Porta и соавт. (Porta et al., 1994) в которой описывается разработка мозаичного вируса китайской вигны как высокопродуктивной системы презентации чужеродных пептидов.

Активированные Т-клетки, которые направлены против пептидов по изобретению, пригодны для терапии. Таким образом, в другом аспекте изобретения предложены активированные Т-клетки, получаемые вышеупомянутыми способами по изобретению.

Активированные Т-клетки, полученные с помощью приведенного выше способа, будут селективно распознавать клетку, которая aberrантно экспрессирует полипептид, включающий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 1 по 288.

Предпочтительно, чтобы Т-клетка распознавала клетку при взаимодействии посредством ее ТКР с комплексом HLA/пептид (например, при связывании). Т-клетки пригодны для способа уничтожения клеток-мишеней у пациента, клетки-мишени которого aberrантно экспрессируют полипептид, включающий аминокислотную последовательность по изобретению, где пациенту вводится эффективное число активированных Т-клеток. Т-клетки, которые введены пациенту, могут быть получены от пациента и активироваться, как описывалось выше (т.е. они являются аутологичными Т-клетками). Альтернативно Т-клетки получают не от пациента, а от другого индивида. Разумеется, предпочтительно, если индивид является здоровым индивидом. Под "здоровым индивидом" авторы изобретения имеют в виду, что индивид имеет хорошее общее состояние здоровья, предпочтительно, чтобы он имел компетентную иммунную систему и, более предпочтительно, не страдал ни одним заболеванием, которое можно легко контролировать и выявить.

Клетками-мишенями *in vivo* для CD8-положительных Т-клеток в соответствии с настоящим изобретением могут быть клетки опухоли (которые иногда экспрессируют молекулы МНС II класса) и/или стромальные клетки, окружающие опухоль (опухолевые клетки) (которые иногда также экспрессируют молекулы МНС II класса; (Dengjel et al., 2006)).

Т-клетки по настоящему изобретению могут быть использованы в качестве активных ингредиентов в терапевтической композиции. Таким образом, в изобретении предложен также способ уничтожения клеток-мишеней у пациента, чьи клетки-мишени aberrантно экспрессируют полипептид, включающий аминокислотную последовательность по изобретению, причем способ включает введение пациенту эффективного числа Т-клеток, как определено выше.

Под понятием "aberrантно экспрессированный" авторы изобретения подразумевают также, что полипептид экспрессирован в избытке по сравнению с нормальными уровнями экспрессии, или что ген является "молчащим" в ткани, из которой образовалась опухоль, однако он экспрессирован в опухоли. Под понятием "экспрессирован в избытке" авторы изобретения понимают, что полипептид представлен на уровне, который по меньшей мере в 1,2 раза выше уровня, представленного в нормальной ткани; предпочтительно по меньшей мере в 2 раза и более предпочтительно по меньшей мере в 5 или 10 раз выше уровня, представленного в нормальной ткани.

Т-клетки могут быть получены способами, известными из уровня техники, к примеру, теми, что описаны выше.

Протоколы для этого так называемого адоптивного переноса Т-клеток хорошо известны из уровня техники. С обзорами можно ознакомиться в работах Gattioni и соавт. и Morgan и соавт. (Gattinoni et al., 2006; Morgan et al., 2006).

Другой аспект настоящего изобретения включает применение пептидов в комплексе с МНС для получения Т-клеточного рецептора, нуклеиновая кислота которого клонирована и введена в клетку-хозяин, предпочтительно Т-клетку. Данная сконструированная Т-клетка может быть затем введена пациенту для лечения рака.

Любая молекула по изобретению, т.е. пептид, нуклеиновая кислота, антитело, вектор экспрессии, клетка, активированная Т-клетка, Т-клеточный рецептор или нуклеиновая кислота, кодирующая его, пригодна для лечения нарушений, характеризующихся клетками, ускользающими от иммунного ответа. Поэтому любая молекула по настоящему изобретению может применяться в качестве медикамента или в производстве медикамента. Молекула может быть использована сама по себе или в комбинации с другой(ими) молекулой(ами) по изобретению или известной(ыми) молекулой(ами).

В настоящем изобретении далее предложен медикамент, который полезен в лечении рака, в частности ГМК, КРК, ГБ, РЖ, рака пищевода, НМРЛ, РПЖ, ПКК, ДГПРЖ/РПРЖ, РЯ, ККМ, меланомы, рака молочной железы, МРЛ, НХЛ, ОМЛ, РЖП, ХК, РМП, РЭМ или ХЛЛ или других злокачественных заболеваний.

В настоящем изобретении также предложен комплект, включающий:

(а) контейнер, который содержит фармацевтическую композицию, как описанная выше, в виде рас-

твора или в лиофилизированной форме;

(б) факультативно - второй контейнер, содержащий разбавитель или восстанавливающий раствор для лиофилизированного состава; и

(в) факультативно - инструкции по (i) применению раствора или (ii) восстановлению раствора и(или) по применению лиофилизированного состава.

Кроме того, комплект может также включать один или более (iii) буферов, (iv) разбавителей, (v) фильтров, (vi) игл или (vii) шприцев. Контейнер является предпочтительно бутылкой, флаконом, шприцем или пробиркой; и он может быть контейнером многоразового применения. Фармацевтическая композиция предпочтительно является лиофилизированной.

Комплект согласно настоящему изобретению предпочтительно включает лиофилизированный состав по настоящему изобретению в подходящем контейнере и инструкции для его восстановления и(или) по его применению. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, (например, двухкамерные флаконы), шприцы (такие как двухкамерные шприцы) и пробирки. Контейнер может быть изготовлен из разных материалов, таких как стекло или пластмасса. Предпочтительно, если комплект и(или) контейнер содержит(ат) инструкции по применению контейнера или связанные с ним инструкции, которые дают указания по восстановлению и(или) применению. Например, на этикетке может быть указано, что лиофилизированный состав должен быть восстановлен до таких концентраций пептидов, как описано выше. На этикетке далее может быть указано, что состав применяется или предназначается для подкожного введения.

Контейнер с составом может быть флаконом многоразового использования, который позволяет повторное введение (например, от 2 до 6 введений) восстановленного состава. Комплект может дополнительно включать второй контейнер, включающий подходящий разбавитель (например, раствор бикарбоната натрия).

После смешивания разбавителя и лиофилизированного состава окончательная концентрация пептида в восстановленном составе составляет предпочтительно по меньшей мере 0,15 мг/мл/пептида (=75 мкг) и предпочтительно не более чем 3 мг/мл/пептида (=1500 мкг). Комплект может дополнительно включать другие материалы, желательные с коммерческой и с точки зрения пользователя, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши в упаковку с инструкциями по применению.

Комплекты по настоящему изобретению могут включать один контейнер, который содержит лекарственную форму фармацевтических композиций в соответствии с настоящим изобретением с другими компонентами или без них (например, другие соединения или фармацевтические композиции этих других соединений) или может иметь отдельные контейнеры для каждого компонента.

Комплект по изобретению предпочтительно включает состав по изобретению, упакованный для применения в комбинации с совместным введением второго соединения (такого как адъюванты (например, ГМ-КСФ), химиотерапевтического средства, природного продукта, гормона или антагониста, средства против ангиогенеза или ингибитора ангиогенеза; апоптоз-индуцирующего средства или хелатора) или их фармацевтической композиции. Компоненты комплекта до введения пациенту могут быть предварительно смешаны, или же каждый компонент может находиться в отдельном контейнере. Компоненты комплекта могут быть предоставлены в виде одного или нескольких жидких растворов, предпочтительно, водного раствора, более предпочтительно, стерильного водного раствора. Компоненты комплекта также могут быть предоставлены в виде твердой формы, которая может быть превращена в жидкость при добавлении подходящих растворителей, которые, предпочтительно, предоставляются в другом, отдельном, контейнере.

Контейнер терапевтического комплекта может быть флаконом, пробиркой, колбой, бутылкой, шприцем или любыми другими средствами, заключающими в себе твердое вещество или жидкость. Обычно, если имеется более одного компонента, комплект содержит второй флакон или другой контейнер, что позволяет произвести отдельное введение. Комплект может также содержать другой контейнер для фармацевтически приемлемой жидкости. Лечебный комплект будет предпочтительно содержать аппарат (например, одну или более игл, шприцы, глазные пипетки, пипетки и т.д.), который обеспечивает введение веществ по изобретению, которые являются компонентами настоящего комплекта.

Настоящий состав подходит для введения пептидов любым приемлемым способом, таким как оральный (энтеральный), назальный, глазной, подкожный, внутрикожный, внутримышечный, внутривенный или чрескожный способ. Предпочтительно, чтобы введение было п/к и наиболее предпочтительно введение в/к с помощью инфузионного насоса.

Так как пептиды по изобретению были выделены из клеток ГМК, КРК, ГБ, РЖ, рака пищевода, НМРЛ, РПЖ, ПКК, ДГПРЖ/РПРЖ, РЯ, ККМ, меланомы, рака молочной железы, МРЛ, НХЛ, ОМЛ, РЖП, ХК, РМП, РЭМ и ХЛЛ, медикамент по изобретению предпочтительно используется для лечения ГМК, КРК, ГБ, РЖ, рака пищевода, НМРЛ, РПЖ, ПКК, ДГПРЖ/РПРЖ, РЯ, ККМ, меланомы, рака молочной железы, МРЛ, НХЛ, ОМЛ, РЖП, ХК, РМП, РЭМ и ХЛЛ.

Кроме того, настоящее изобретение далее относится к способу получения персонализированного фармацевтического препарата для отдельного пациента, включающего производство фармацевтической

композиции, включающей по меньшей мере один пептид, выбранный из хранилища предварительно прошедших скрининг пептидов TUMAP, где по меньшей мере один пептид, используемый в фармацевтической композиции, выбран по его пригодности для отдельного пациента. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция является вакциной. Способ может быть адаптирован для получения Т-клеточных клонов для дальнейшего применения, например, при выделении ТКР или растворимых антител или других методов лечения.

"Персонализированный фармацевтический препарат" подразумевает разработанные специально для отдельного пациента терапевтические средства, которые будут применяться исключительно для лечения такого пациента, включая активно персонализированные противораковые вакцины и средства адоптивной клеточной терапии с использованием аутологичной ткани пациента.

В контексте настоящего изобретения термин "хранилище" относится к группе или набору пептидов, которые предварительно прошли скрининг на иммуногенность и/или избыточную презентацию в конкретном виде опухоли. Понятие "хранилище" не подразумевает, что конкретные пептиды, включенные в вакцину, были изготовлены заблаговременно и хранились в реальном помещении, хотя эта возможность также принимается во внимание. Во внимание определенно принимается тот факт, что пептиды могут быть изготовлены *de novo* для каждой производимой индивидуализированной вакцины, или могут быть получены заранее и находиться на хранении. Хранилище (например, в форме банка данных) состоит из опухолеассоциированных пептидов, которые в высокой степени избыточно экспрессировались в опухолевой ткани пациентов с ГМК, КРК, ГБ, РЖ, раком пищевода, НМРЛ, РПЖ, ПКК, ДГПрЖ/РПрЖ, РЯ, ККМ, меланомой, раком молочной железы, МРЛ, НХЛ, ОМЛ, РЖП, ХК, РМП, РЭМ или ХЛЛ с различными HLA-A, HLA-B и HLA-C-аллелями. Оно может содержать пептиды, связанные с молекулами MHC I класса и MHC II класса или удлиненные пептиды, связанные с молекулами MHC I класса. Помимо опухолеассоциированных пептидов, собранных из нескольких тканей опухолей, хранилище может содержать маркерные пептиды, связанные с HLA-A*02 и HLA-A*24. Эти пептиды позволяют произвести количественное сравнение интенсивности Т-клеточного иммунного ответа, индуцированного пептидами TUMAP, и, следовательно, позволяют сделать важный вывод о способности вакцины вызывать противоопухолевые ответы. Во-вторых, они выполняют функцию важных пептидов положительного контроля, полученных "не из собственного" антигена в случае, если у пациента не наблюдаются вызванные вакциной Т-клеточные ответы на пептиды TUMAP, полученные из "собственных" антигенов. И, в-третьих, оно может позволить сделать заключения относительно статуса иммунокомпетентности пациента.

Пептиды TUMAP настоящего изобретения для хранилища были идентифицированы с помощью интегрированного подхода функциональной геномики, комбинирующего анализ экспрессии генов, масс-спектрометрию и Т-клеточную иммунологию (XPresident®). Этот подход гарантирует, что только те пептиды TUMAP, которые действительно присутствуют в большом проценте опухолей, но не экспрессируются или экспрессируются лишь минимально на нормальной ткани, были выбраны для последующего анализа. В целях первоначального отбора пептидов образцы ГМК, КРК, ГБ, РЖ, рака пищевода, НМРЛ, РПЖ, ПКК, ДГПрЖ/РПрЖ, РЯ, ККМ, меланомы, рака молочной железы, МРЛ, НХЛ, ОМЛ, РЖП, ХК, РМП, РЭМ или ХЛЛ пациентов и крови здоровых доноров были проанализированы поэтапно.

1) Анализ экспрессии информационной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) всего генома использовали, чтобы идентифицировать гены, экспрессируемые на очень низких уровнях в важных нормальных (не раковых) тканях. Оценивали, экспрессируются ли избыточно эти гены в злокачественной ткани (ГМК, КРК, ГБ, РЖ, НМРЛ, РПЖ, ПКК, ДГПрЖ/РПрЖ, МРЛ, НХЛ, ОМЛ, РЖП, ХК, РМП, РЭМ) по сравнению со спектром нормальных органов и тканей.

2) HLA-лиганды из злокачественного материала (ГМК, КРК, ГБ, РЖ, рака пищевода, НМРЛ, РПЖ, ПКК, ДГПрЖ/РПрЖ, РЯ, ККМ, меланомы, рака молочной железы, МРЛ, НХЛ, ОМЛ, РЖП, ХК, РМП, РЭМ, ХЛЛ) идентифицировали с помощью масс-спектрометрии.

3) Идентифицированные HLA-лиганды сравнивали с данными по экспрессии генов. Пептиды, презентуемые в избытке или селективно презентуемые на опухолевой ткани, предпочтительно кодируемые селективно экспрессированными или экспрессированными в избытке генами, выявленными на этапе 2, считали подходящими TUMAP-кандидатами для мультипептидной вакцины.

4) Было произведено изучение литературы для выявления дополнительных свидетельств, подтверждающих релевантность идентифицированных в качестве TUMAP пептидов.

5) Релевантность избыточной экспрессии на уровне мРНК подтверждали повторным обнаружением выбранных на этапе 3 пептидов TUMAP на опухолевой ткани и отсутствием (или нечастым обнаружением) на здоровых тканях.

6) В целях оценки того, осуществима ли индукция *in vivo* Т-клеточных ответов выбранными пептидами, был проведен анализ иммуногенности *in vitro* при использовании человеческих Т-клеток здоровых доноров, а также пациентов, больных ГМК, КРК, ГБ, РЖ, раком пищевода, НМРЛ, РПЖ, ПКК, ДГПрЖ/РПрЖ, РЯ, ККМ, меланомой, раком молочной железы, МРЛ, НХЛ, ОМЛ, РЖП, ХК, РМП, РЭМ или ХЛЛ.

В одном из аспектов пептиды предварительно прошли скрининг на иммуногенность до их включения в хранилище. В качестве примера, но не для ограничения изобретения, иммуногенность пептидов,

включенных в хранилище, определяется способом, включающим прайминг Т-клеток *in vitro* посредством повторных стимуляций CD8⁺ Т-клеток здоровых доноров клетками, презентирующими искусственный антиген, нагруженными комплексами пептид-МНС и антителами к CD28.

Этот способ является предпочтительным для редких видов рака и пациентов с редким профилем экспрессии. В отличие от мультипептидных коктейлей с постоянным составом, уже разработанных на данное время, "хранилище" позволяет достигнуть существенно более высокого соответствия фактической экспрессии антигенов в опухоли составу вакцины. Выбранные отдельные пептиды или комбинации из нескольких "готовых к применению" пептидов будут использоваться для каждого пациента в рамках мультитаргетного подхода. Теоретически, подход, основанный на выборе, например, 5 различных антигенных пептидов из библиотеки из 50 экземпляров, уже приведет приблизительно к 17 миллионам возможных составов лекарственного препарата (ЛП).

В одном аспекте для включения в вакцину пептиды выбирают по их пригодности для отдельного пациента на основе способа в соответствии с настоящим изобретением, как описано в настоящем документе или как изложено ниже.

Фенотип HLA, данные транскриптомики и протеомики собирают с опухолевого материала и образцов крови пациентов для идентификации наиболее подходящих пептидов для каждого пациента, в состав которых входят пептиды TUMAP как из хранилища, так и уникальные для пациента (т.е. мутированные). Выбирать будут те пептиды, которые селективно или избыточно экспрессируются в опухолях пациентов и, где это возможно, проявляют сильную иммуногенность *in vitro* при анализе с индивидуальными МКПК пациента.

Предпочтительно, чтобы пептиды, включенные в вакцину, были идентифицированы способом, включающим: (а) идентификацию опухолеассоциированных пептидов (TUMAP), презентруемых опухолевым образцом отдельного пациента; (б) сравнение идентифицированных на этапе (а) пептидов с хранилищем (банком данных) пептидов, как описано выше; и (в) выбор по меньшей мере одного пептида из хранилища (банка данных), который коррелирует с опухолеассоциированным пептидом, идентифицированным у пациента. Например, пептиды TUMAP, презентруемые опухолевым образцом, идентифицируют с помощью: (a1) сравнения данных по экспрессии в опухолевом образце с данными нормальной ткани, соответствующей типу ткани опухолевого образца, для идентификации белков, которые в опухолевом образце экспрессируются в избытке или aberrантно; и (a2) установления корреляции между данными экспрессии и последовательностями лигандов МНС, связанных с молекулами МНС I и(или) II класса в опухолевом образце, в целях идентификации лигандов МНС, которые получены из белков, избыточно или aberrантно экспрессируемых опухолью. Предпочтительно, если последовательности лигандов МНС идентифицируются с помощью элюирования связанных пептидов из молекул МНС, выделенных из опухолевого образца, и секвенирования элюированных лигандов. Предпочтительно, если опухолевый образец и нормальная ткань получены от одного и того же пациента.

Помимо этого или в качестве альтернативы этому, при выборе пептидов с использованием модели хранилища (банка данных) пептиды TUMAP могут быть идентифицированы у пациента *de novo* и затем быть включены в вакцину. В качестве одного примера пептиды-кандидаты TUMAP могут быть идентифицированы у пациента с помощью (a1) сравнения данных по экспрессии в опухолевом образце с данными нормальной ткани, соответствующей типу ткани опухолевого образца, для идентификации белков, которые в опухолевом образце экспрессируются в избытке или aberrантно; и (a2) установления корреляции между данными экспрессии и последовательностями лигандов МНС, связанных с молекулами МНС I и(или) II класса в опухолевом образце, в целях идентификации лигандов МНС, которые получены из белков, избыточно или aberrантно экспрессируемых опухолью. В качестве другого примера могут быть идентифицированы белки, имеющие мутации, являющиеся уникальными для опухолевого образца, соотносимого с соответствующей нормальной тканью отдельного пациента, и могут быть идентифицированы пептиды TUMAP, специфической мишенью которых является мутация. Например, геном опухоли и соответствующей нормальной ткани могут быть секвенированы методом полногеномного секвенирования: для обнаружения несинонимичных мутаций на кодирующих белок участках генов геномную ДНК и РНК экстрагируют из опухолевых тканей, а нормальную, не имеющую мутаций геномную ДНК зародышевой линии экстрагируют из мононуклеарных клеток периферической крови (МПК). Применяемый подход секвенирования нового поколения (NGS) заключается в повторном секвенировании кодирующих белок участков (повторное секвенирование экзона). В этих целях экзонную ДНК из человеческих образцов фиксируют с помощью поставляемых изготовителем наборов для обогащения целевыми фрагментами, за чем следует секвенирование, например, с помощью системы HiSeq2000 (Illumina). В дополнение к этому опухолевую мРНК секвенируют для прямого количественного определения генной экспрессии и подтверждения того, что мутировавшие гены экспрессированы в опухолях пациентов. Считывание полученных в результате миллионов последовательностей осуществляется алгоритмами программного обеспечения. Получаемый список содержит мутации и экспрессию генов. Опухолеспецифические соматические мутации определяют сравнением с вариантами зародышевой линии из МПК и устанавливают приоритетность. Идентифицированные *de novo* пептиды могут быть затем испытаны на иммуногенность, как описывается выше в случае хранилища, и пептиды-кандидаты TUMAP, обладающие подходящей иммуно-

генностью, выбирают для включения в вакцину.

В отдельном варианте осуществления изобретения пептиды, включенные в вакцину, идентифицируют с помощью: (а) идентификации опухолеассоциированных пептидов (TUMAP), презентируемых опухолевым образцом отдельного пациента способами, описанными выше; (б) сравнения пептидов, идентифицированных на этапе (а) с хранилищем пептидов, как описано выше, которые предварительно прошли скрининг на иммуногенность и избыточную презентацию в опухолях по сравнению с соответствующими нормальными тканями; (в) выбора по меньшей мере одного пептида из хранилища, который коррелирует с опухолеассоциированным пептидом, идентифицированным у пациента; и (г) факультативно, выбора по меньшей мере одного пептида, идентифицированного *de novo* на этапе (а) с подтверждением его иммуногенности.

В отдельном варианте осуществления изобретения пептиды, включенные в вакцину, идентифицируют с помощью: (а) идентификации опухолеассоциированных пептидов (TUMAP), презентируемых опухолевым образцом отдельного пациента; и (б) выбора по меньшей мере одного пептида, идентифицированного *de novo* на этапе (а) и подтверждения его иммуногенности.

После того, как отобраны пептиды для персонализированной вакцины на основе пептидов, изготавливают вакцину. Вакцина - это предпочтительно жидкая лекарственная форма, состоящая из отдельных пептидов, растворенных в ДМСО в концентрации 20-40%, предпочтительно около 30-35%, такой как около 33% ДМСО.

Каждый пептид, включаемый в продукт, растворяют в ДМСО. Концентрация отдельных пептидных растворов должна выбираться в зависимости от числа пептидов, предназначенных для включения в продукт. Растворы отдельных пептидов в ДМСО смешивают в равном соотношении для получения раствора, содержащего все пептиды, предназначенные для включения в продукт, с концентрацией ~2,5 мг/мл на пептид. Смешанный раствор затем разбавляют водой для инъекций в соотношении 1:3 для достижения концентрации 0,826 мг/мл на пептид в 33% ДМСО. Разбавленный раствор фильтруют через стерильный фильтр с размером пор 0,22 мкм. Получают конечный нерасфасованный раствор.

Конечный нерасфасованный раствор разливают во флаконы и хранят при -20°C до использования. Один флакон содержит 700 мкл раствора, содержащего 0,578 мг каждого пептида. Из них 500 мкл (прибл. 400 мкг на пептид) будут вводить с помощью внутрикожной инъекции.

Кроме того, пептиды по настоящему изобретению пригодны не только для лечения рака, но и также в качестве диагностических средств. Так как пептиды были получены из клеток ГМК, КРК, ГБ, РЖ, рака пищевода, НМРЛ, РПЖ, ПКК, ДГПрЖ/РПрЖ, РЯ, ККМ, меланомы, рака молочной железы, МРЛ, НХЛ, ОМЛ, РЖП, ХК, РМП, РЭМ и ХЛЛ и так как было определено, что данные пептиды не присутствуют или присутствуют в малом количестве в нормальных тканях, то эти пептиды могут быть использованы для диагностики наличия рака.

Присутствие заявленных пептидов на тканевых биоптатах и в образцах крови может помочь патоморфологу в постановке диагноза рака. Выявление конкретных пептидов с помощью антител, масс-спектрометрии или других методов, известных из уровня техники, могут дать патоморфологу свидетельства того, что образец ткани является злокачественной или воспаленной или пораженной заболеванием вообще тканью, или же может использоваться в качестве биомаркера ГМК, КРК, ГБ, РЖ, рака пищевода, НМРЛ, РПЖ, ПКК, ДГПрЖ/РПрЖ, РЯ, ККМ, меланомы, рака молочной железы, МРЛ, НХЛ, ОМЛ, РЖП, ХК, РМП, РЭМ или ХЛЛ. Присутствие групп пептидов может позволить классифицировать или выделить подклассы пораженных тканей.

Обнаружение пептидов на образцах пораженной заболеванием ткани может позволить принять решение о пользе от терапии, воздействующей на иммунную систему, в особенности, если Т-лимфоциты, как известно или ожидается, задействованы в механизме действия. Отсутствие экспрессии МНС является хорошо описанным механизмом, при котором инфицированные или злокачественные клетки уклоняются от иммунного контроля. Таким образом, присутствие пептидов показывает, что этот механизм не используется проанализированными клетками.

Пептиды по настоящему изобретению могут использоваться в анализе ответов лимфоцитов на действие этих пептидов, таких как Т-клеточные ответы или ответы в виде антител к пептиду или пептиду в комплексе с молекулами МНС. Данные ответы лимфоцитов могут использоваться в качестве прогностических маркеров для принятия решения о дальнейших этапах терапии. Данные ответы могут также использоваться в качестве суррогатных маркеров ответов в иммунотерапевтических подходах, направленных на индуцирование ответов лимфоцитов с помощью различных средств, например, вакцинации белком, нуклеиновыми кислотами, аутологичными материалами, адоптивным переносом лимфоцитов. В условиях, когда проводится генная терапия, в целях оценки побочных эффектов могут быть проанализированы ответы лимфоцитов на пептиды. Мониторинг реакций лимфоцитов может также быть ценным инструментом для обследований в рамках последующего наблюдения после трансплантации, к примеру, для выявления реакции "хозяин против трансплантата" и "трансплантат против хозяина".

Настоящее изобретение будет описано ниже с помощью примеров, которые описывают его предпочтительные варианты осуществления, со ссылкой на сопровождающие фигуры, тем не менее, не ограничивая объема изобретения. В соответствии с целями настоящего изобретения все цитируемые источ-

ники включены в данное описание во всей полноте путем ссылки.

Фигуры

На фиг. 1 представлена избыточная презентация различных пептидов в различных раковых тканях по сравнению с нормальными тканями. В анализ были включены данные более 170 образцов нормальных тканей и 376 образцов тканей, пораженных раком. Показаны только образцы, где была обнаружена презентация пептида. Фиг. 1A) ген: CENPE, пептид: KLQEKIQEL (SEQ ID NO: 1), ткани слева направо: 4 линии клеток лейкоза, 1 линия клеток рака поджелудочной железы, 1 клеточная линия меланомы, 2 образца нормальной ткани (1 надпочечник, 1 селезенка), 31 образец тканей первичного рака (1 рак головного мозга, 4 рака толстой кишки, 1 рак пищевода, 1 рак почки, 2 рака печени, 16 раков легких, 4 рака яичника, 1 рак прямой кишки, 1 рак желудка). Фиг. 1B) ген: KIF15, пептид: QLIEKNWLL (SEQ ID NO.: 10), ткани слева направо: 5 линий клеток лейкоза, 1 линия клеток рака поджелудочной железы, 1 линия клеток миелоидного лейкоза, 1 образец нормальной ткани (1 надпочечник), 29 образцов раковой ткани (4 рака толстой кишки, 2 рака пищевода, 1 лейкоз, 1 рак печени, 10 раков легких, 11 раков яичника). Фиг. 1C) Ген: HAVCR1, пептид: LLDPKTIFL (SEQ ID NO.: 11), ткани слева направо: 1 линия клеток рака почки, 13 образцов раковой ткани (8 раков почки, 1 рак печени, 2 рака легких, 2 рака прямой кишки). Фиг. 1D) ген: RPGRIP1L, пептид: RLHDENILL (SEQ ID NO.: 13), ткани слева направо: 1 линия клеток рака почки, 1 линия клеток рака предстательной железы, 1 линия клеток меланомы, 50 образцов раковой ткани (4 рака головного мозга, 1 рак толстой кишки, 2 рака пищевода, 3 рака почки, 2 рака печени, 23 рака легких, 7 раков яичника, 2 рака поджелудочной железы, 2 рака предстательной железы, 3 рака прямой кишки, 1 рак желудка). На фиг. 1E-J представлена избыточная презентация различных пептидов в различных раковых тканях по сравнению с нормальными тканями. В анализ были включены данные более 320 образцов нормальных тканей и 462 образцов тканей, пораженных раком. Показаны только образцы, где была обнаружена презентация пептида. Фиг. 1E) ген: DNAH14, пептид: SVLEKEIYSI (SEQ ID NO.: 2), ткани слева направо: 4 клеточные линии (3 клеток крови, 1 поджелудочной железы), 2 нормальные ткани (1 лимфатический узел, 1 трахея), 52 раковых тканей (2 рака желчных протоков, 1 рак миелоидных клеток, 3 рака лейкоцитов, 5 раков молочной железы, 1 рак пищевода, 1 рак пищевода и желудка, 1 рак желчного пузыря, 4 рака толстой кишки, 7 раков легких, 6 раков лимфатических узлов, 7 раков яичника, 4 рака предстательной железы, 4 рака кожи, 2 рака мочевого пузыря, 4 рака матки). Фиг. 1F) ген: MAGEA3, MAGEA6, пептид: KIWEELSVLEV (SEQ ID NO.: 40), ткани слева направо: 8 раковых тканей (1 рак печени, 3 рака легких, 2 рака кожи, 1 рак желудка, 1 рак мочевого пузыря). Фиг. 1G) ген: HMX1, пептид: FLIENLLAA (SEQ ID NO.: 67), ткани слева направо: 7 раковых тканей (4 рака головного мозга, 2 рака легких, 1 рак матки). Фиг. 1H) ген: CCDC138, пептид: FLLEREQLL (SEQ ID NO.: 84), ткани слева направо: 3 клеточные линии (2 линии клеток крови, 1 линия кожи), 24 раковых тканей (1 рак миелоидных клеток, 3 лейкоза, 1 рак костного мозга, 1 рак молочной железы, 1 рак почки, 2 рака толстой кишки, 3 рака прямой кишки, 1 рак легких, 7 раков лимфатических узлов, 3 рака мочевого пузыря, 1 рак матки). Фиг. 1I) ген: CLSPN, пептид: SLLNQPKAV (SEQ ID NO.: 235), ткани слева направо: 13 клеточных линий (3 линии клеток крови, 2 линии почек, 8 линий поджелудочной железы), 30 раковых тканей (1 рак миелоидных клеток, 1 лейкоз, 2 рака головного мозга, 2 рака молочной железы, 2 рака пищевода, 1 рак желчного пузыря, 1 рак прямой кишки, 2 рака печени, 4 рака легких, 5 раков лимфатических узлов, 2 рака яичника, 2 рака кожи, 4 рака мочевого пузыря, 1 рак матки). Фиг. 1J) ген: SPC25, пептид: GLAE-FQENV (SEQ ID NO.: 243), ткани слева направо: 3 клеточные линии (1 линия клеток крови, 1 линия почки, 1 линия поджелудочной железы), 67 раковых тканей (1 рак желчных протоков, 4 лейкоза, 1 рак миелоидных клеток, 2 рака головного мозга, 3 рака молочной железы, 4 рака пищевода, 2 рака желчного пузыря, 2 рака толстой кишки, 1 рак прямой кишки, 2 рака печени, 15 раков легких, 8 раков лимфатических узлов, 9 раков яичника, 3 рака кожи, 4 рака мочевого пузыря, 6 раков матки).

На фиг. 2 представлены примеры профилей экспрессии (относительная экспрессия в сравнении с нормальной почкой) исходных генов настоящего изобретения, которые в высокой степени экспрессированы в избытке или исключительно экспрессированы в различных видах рака в сравнении с нормальными тканями. Фиг. 2A) PRIM2 - ткани слева направо: надпочечная железа, артерия, костный мозг, головной мозг (целиком), молочная железа, толстая кишка, пищевод, сердце, почка (три повторных измерения), лейкоциты, печень, легкие, лимфатический узел, яичник, поджелудочная железа, плацента, предстательная железа, слюнная железа, скелетная мышца, кожа, тонкая кишка, селезенка, желудок, семенник, вилочковая железа, щитовидная железа, мочевой пузырь, шейка матки, матка, вена (каждая нормальная ткань представляет собой совокупность образцов нескольких доноров), 22 отдельных образца раковой ткани предстательной железы. Фиг. 2B) СНЕК1 - ткани слева направо: надпочечная железа, артерия, костный мозг, головной мозг (целиком), молочная железа, толстая кишка, пищевод, сердце, почка (три повторных измерения), лейкоциты, печень, легкие, лимфатический узел, яичник, поджелудочная железа, плацента, предстательная железа, слюнная железа, скелетная мышца, кожа, тонкая кишка, селезенка, желудок, семенник, вилочковая железа, щитовидная железа, мочевой пузырь, шейка матки, матка, вена (каждая нормальная ткань представляет собой совокупность образцов нескольких доноров), 3 отдельных образца нормальной ткани толстой кишки, 10 отдельных образцов раковой ткани толстой кишки. Фиг. 2C) TTC30A - ткани слева направо: надпочечная железа, артерия, костный мозг, головной мозг

(целиком), молочная железа, толстая кишка, пищевод, сердце, почка (три повторных измерения), лейкоциты, печень, легкие, лимфатический узел, яичник, поджелудочная железа, плацента, предстательная железа, слюнная железа, скелетная мышца, кожа, тонкая кишка, селезенка, желудок, семенник, вилочковая железа, щитовидная железа, мочевого пузырь, шейка матки, матка, вена (каждая нормальная ткань представляет собой совокупность образцов нескольких доноров), 30 отдельных образцов раковой ткани головного мозга. Фиг. 2D) TRIP13 - ткани слева направо: надпочечная железа, артерия, костный мозг, головной мозг (целиком), молочная железа, толстая кишка, пищевод, сердце, почка (три повторных измерения), лейкоциты, печень, легкие, лимфатический узел, яичник, поджелудочная железа, плацента, предстательная железа, слюнная железа, скелетная мышца, кожа, тонкая кишка, селезенка, желудок, семенник, вилочковая железа, щитовидная железа, мочевого пузырь, шейка матки, матка, вена (каждая нормальная ткань представляет собой совокупность образцов нескольких доноров), 1 отдельный образец нормальной ткани легкого, 38 отдельных образцов раковой ткани легких. Фиг. 2E) MXRA5 -ткани слева направо: надпочечная железа, артерия, костный мозг, головной мозг (целиком), молочная железа, толстая кишка, пищевод, сердце, почка (три повторных измерения), лейкоциты, печень, легкие, лимфатический узел, яичник, поджелудочная железа, плацента, предстательная железа, слюнная железа, скелетная мышца, кожа, тонкая кишка, селезенка, желудок, семенник, вилочковая железа, щитовидная железа, мочевого пузырь, шейка матки, матка, вена (каждая нормальная ткань представляет собой совокупность образцов нескольких доноров), 9 отдельных образцов раковой ткани поджелудочной железы. На фиг. 2F-H представлены примеры профилей экспрессии исходных генов настоящего изобретения, которые в высокой степени экспрессированы в избытке или исключительно экспрессированы в ряду нормальных тканей (белые столбцы) и различных раковых образцах (черные столбцы). Фиг. 2F) MMP11, MMP13 (SEQ ID No: 24) - ткани слева направо: 80 образцов нормальных тканей (6 артерий, 2 клетки крови, 2 головных мозга, 1 сердце, 2 печени, 3 легких, 2 вены, 1 жировая ткань, 1 надпочечная железа, 5 костных мозгов, 1 хрящевая ткань, 1 толстая кишка, 1 пищевод, 2 глаза, 2 желчных пузыря, 1 почка, 6 лимфатических узлов, 4 поджелудочные железы, 2 периферических нерва, 2 гипофиза, 1 прямая кишка, 2 слюнные железы, 2 скелетные мышцы, 1 кожа, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 щитовидная железа, 7 трахей, 1 мочевого пузырь, 1 молочная железа, 5 яичников, 5 плацент, 1 предстательная железа, 1 семенник, 1 вилочковая железа, 1 матка), 50 образцов раковой ткани (10 раков молочной железы, 4 рака желчных протоков, 6 раков желчного пузыря, 11 раков пищевода, 10 раков мочевого пузыря, 10 раков матки). Фиг. 2G) NORMAD1 (SEQ ID No: 168) - ткани слева направо: 80 образцов нормальных тканей (6 артерий, 2 клетки крови, 2 головных мозга, 1 сердце, 2 печени, 3 легких, 2 вены, 1 жировая ткань, 1 надпочечная железа, 5 костных мозгов, 1 хрящевая ткань, 1 толстая кишка, 1 пищевод, 2 глаза, 2 желчных пузыря, 1 почка, 6 лимфатических узлов, 4 поджелудочные железы, 2 периферических нерва, 2 гипофиза, 1 прямая кишка, 2 слюнные железы, 2 скелетные мышцы, 1 кожа, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 щитовидная железа, 7 трахей, 1 мочевого пузырь, 1 молочная железа, 5 яичников, 5 плацент, 1 предстательная железа, 1 семенник, 1 вилочковая железа, 1 матка), 41 образец раковых тканей (10 раков молочной железы, 10 раков кожи, 11 мелкоклоточных раков легких, 10 мелкоклоточных раков легких). Фиг. 2H) IGF2BP1, IGF2BP3 (SEQ ID No: 274) - ткани слева направо: 80 образцов нормальных тканей (6 артерий, 2 клетки крови, 2 головных мозга, 1 сердце, 2 печени, 3 легких, 2 вены, 1 жировая ткань, 1 надпочечная железа, 5 костных мозгов, 1 хрящевая ткань, 1 толстая кишка, 1 пищевод, 2 глаза, 2 желчных пузыря, 1 почка, 6 лимфатических узлов, 4 поджелудочные железы, 2 периферических нерва, 2 гипофиза, 1 прямая кишка, 2 слюнные железы, 2 скелетные мышцы, 1 кожа, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 щитовидная железа, 7 трахей, 1 мочевого пузырь, 1 молочная железа, 5 яичников, 5 плацент, 1 предстательная железа, 1 семенник, 1 вилочковая железа, 1 матка), 53 образца раковых тканей (4 рака желчных протоков, 6 раков желчного пузыря, 10 раков лимфатических узлов, 12 раков яичника, 11 раков пищевода, 10 раков легких).

На фиг. 3 показаны типичные данные по иммуногенности: результаты проточного цитометрического анализа после пептид-специфического окрашивания мультимеров.

На фиг. 4A-R в верхней части: Медианные показатели интенсивности МС-сигналов технических репликатов нанесены в виде цветных точек для единичных HLA-A*02-положительных образцов нормальной ткани (зеленые или серые точки) и опухолевых образцов (красные точки), на которых был обнаружен пептид. Опухолевые и нормальные образцы сгруппированы по органам происхождения, а на диаграммах размаха ("ящик с усами") представлены медиана, 25-ый и 75-ый процентиля (ящик) и минимум и максимум (усы) нормализованного уровня интенсивности сигнала для нескольких образцов. Нормальные органы расположены в соответствии с категориями риска (клетки крови, сердечно-сосудистая система, головной мозг, печень, легкие: высокий уровень риска, темно-зеленые точки; органы репродуктивной системы, молочная железа, предстательная железа: низкий уровень риска, серые точки; все остальные органы: средний уровень риска; светло-зеленые точки). Нижняя часть: Относительная частота обнаружения пептида в каждом органе представлена в виде столбчатой диаграммы. Цифры под графиком обозначают число образцов, на которых был обнаружен пептид из общего числа проанализированных образцов для каждого органа (N=298 для образцов нормальных тканей, N=461 для образцов опухолевых тканей). Если пептид был обнаружен на образце, но по техническим причинам не могло быть проведено

количественное определение, образец включали в данный график репрезентации частоты обнаружения, но в верхней части фигуры точку не обозначали. Ткани (слева направо): Нормальные образцы: артерия; клетки крови; головной мозг; сердце; печень; легкие; вена; жировая ткань; надпочечная железа; костный мозг; толстая и прямая кишка; двенадцатиперстная кишка; пищевод; желчный пузырь; лимфатический узел; поджелудочная железа; паращитовидная железа; брюшина; гипофиз; слюнная железа; скелетная мышца; кожа; тонкая кишка; селезенка; желудок; щитовидная железа; трахея; мочеточник; мочевой пузырь; молочная железа; яичник; плацента; предстательная железа; семенник; вилочковая железа; матка. Опухолевые образцы: острый миелоидный лейкоз (AML); рак предстательной железы (PCA); рак молочной железы (BRCA); хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL); колоректальный рак (CRC); рак желчного пузыря (GALB); гепатоклеточная карцинома (HCC); меланома (MEL); неходжкинская лимфома (NHL); рак яичника (OC); рак пищевода (OSCAR); рак пищевода/желудка (OSC_GC); рак поджелудочной железы (PC); глиобластома (GB); рак желудка (GC); немелкоклеточный рак легких (NSCLC); почечноклеточная карцинома (RCC); мелкоклеточный рак легких (SCLC); карцинома мочевого пузыря (UBC); рак эндометрия матки (UEC).

На фиг. 5A-R представлены примеры профилей экспрессии исходных генов настоящего изобретения, которые экспрессированы в избытке в различных образцах раковой ткани. Опухолевые (красные точки) и нормальные (зеленые или серые точки) образцы сгруппированы по органам происхождения, а на диаграммах размаха ("ящик с усами") представлены медиана, 25-ый и 75-ый процентиля (ящик) и минимум и максимум (усы) значений RPKM. Нормальные органы расположены в соответствии с категориями риска. RPKM=число ридов на тысячу пар нуклеотидов, отнесенное на миллион картированных ридов. Нормальные образцы: артерия; клетки крови; головной мозг; сердце; печень; легкие; вена; жировая ткань; надпочечная железа; костный мозг; хрящевая ткань; толстая и прямая кишка; пищевод; глаз; желчный пузырь; почка; лимфатический узел; нерв; поджелудочная железа; гипофиз; слюнная железа; скелетная мышца; кожа; тонкая кишка; селезенка; желудок; щитовидная железа; трахея; мочевой пузырь; молочная железа; яичник; плацента; предстательная железа; семенник; вилочковая железа; матка. Опухолевые образцы: острый миелоидный лейкоз (AML); рак предстательной железы (PCA); рак молочной железы (BRCA); хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL); колоректальный рак (CRC); рак желчного пузыря (GALB); гепатоклеточная карцинома (HCC); меланома (MEL); неходжкинская лимфома (NHL); рак яичника (OC); рак пищевода (OSCAR); рак поджелудочной железы (PC); глиобластома (GB); рак желудка (GC); немелкоклеточный рак легких (NSCLC); почечноклеточная карцинома (RCC); мелкоклеточный рак легких (SCLC); карцинома мочевого пузыря (UBC); рак эндометрия матки (UEC).

На фиг. 6A-M представлены отдельные результаты пептид-специфических Т-клеточных ответов CD8+ *in vitro* здорового HLA-A*02+ донора. CD8+ Т-клетки примировали с помощью искусственных АПК, стимулированных моноклональными антителами к CD28 и HLA-A*02 в комплексе, например, с пептидом с последовательностью SeqID No 11 (А, левая секция) или пептидом с последовательностью SeqID No 14 (В, левая секция), соответственно (SeqID No 157 (С), 233 (D), 85 (Е), 89 (F), 155 (G), 153 (H), 264 (I), 117 (J), 253 (K), 39 (L) и 203 (M)). После трех циклов стимуляции обнаружение клеток, реагирующих с пептидом, производилось с помощью двойного окрашивания мультимеров, используя релевантный мультимер, например А*24/KLHL2411 (А) или А*24/ APOB14 (В). Левые секции (А и В) представляют собой контрольное окрашивание клеток, простимулированных нерелевантными комплексами пептида и А*02. Из числа отдельных жизнеспособных клеток путем гейтирования выделяли CD8+ лимфоциты. Гейты Буля помогали исключить ложно-положительные ответы, обнаруженные с помощью мультимеров, специфических в отношении различных пептидов. Указывается частота выявления специфических мультимер+ клеток среди CD8+ лимфоцитов.

На фиг. 7A-C представлена избыточная презентация различных пептидов в различных раковых тканях по сравнению с нормальными тканями. В анализ были включены данные более 320 образцов нормальных тканей и 462 образцов тканей, пораженных раком. Показаны только образцы, где была обнаружена презентация пептида. Фиг. 7A) ген: CCR8, пептид: LLIPFTIFM (SEQ ID NO.: 43), ткани слева направо: 16 раковых тканей (1 рак желчных протоков, 1 рак молочной железы, 1 рак толстой кишки, 7 раков легких, 2 рака лимфатических узлов, 3 рака яичника, 1 рак кожи). Фиг. 7B) ген: CXCR5, пептид: ILVTSIFFL (SEQ ID NO.: 152), ткани слева направо: 6 нормальных тканей (1 лимфатический узел, 5 селезенки), 16 раковых тканей (8 лейкозов, 8 раков лимфатических узлов). Фиг. 7C) ген: CYSLTR1, пептид: VILTSSPFL (SEQ ID NO.: 156), ткани слева направо: 3 нормальных ткани (1 легкое, 1 лимфатический узел, 1 селезенка), 11 раковых тканей (2 рака молочной железы, 5 лейкозов, 3 рака лимфатических узлов, 1 рак миелоидных клеток).

Примеры

Пример 1. Идентификация и количественное определение опухолеассоциированных пептидов, презентуемых на поверхности клетки

Образцы тканей

Опухолевые ткани пациентов были получены из компании Asterand (Детройт, США и Ройстон, Хартфордшир, Великобритания); Университетской клиники Валь д'Хеброн (Барселона); компании BioServe (Белтсвилл, Мэриленд, США); Центра иммунотерапии рака (CCIT), Клиники Херлев (Херлев);

компаний Geneticist Inc. (Глендейл, Калифорния, США); Университетской клиники г. Женевы; Университетской клиники г. Гейдельберг; Университетской клиники г. Мюнхена; Медицинского университета префектуры Киото (KPUM); Осацкого университета (OCU); компании ProteoGenex Inc., (Кальвер-Сити, Калифорния, США); Университетской клиники г. Тюбинген. Нормальные ткани были получены из компаний Bio-Options Inc., Калифорния, США; BioServe, Белтсвилль, Мэриленд, США; Capital BioScience Inc., Роквилль, Мэриленд, США; Geneticist Inc., Глендейл, Калифорния, США; Университетской клиники г. Женевы; Университетской клиники г. Гейдельберг; Университетской клиники г. Мюнхена; компании ProteoGenex Inc., Кальвер-Сити, Калифорния, США; Университетской клиники г. Тюбинген. Перед проведением хирургической операции или аутопсии было получено информированное согласие всех пациентов в письменной форме. Сразу же после удаления ткани были подвергнуты шоковой заморозке и хранились до выделения TUMAP-пептидов при температуре -70°C или ниже.

Выделение пептидов HLA из образцов тканей

Пулы пептидов HLA из подвергнутых шоковой заморозке образцов тканей были получены методом иммунопреципитации из плотных тканей в соответствии с незначительно измененным протоколом (Falk et al., 1991; Seeger et al., 1999) при использовании HLA-A*02-специфического антитела BB7.2 или HLA-A, -B, -C-специфического антитела W6/32, CNBr-активированной сефарозы, кислотной обработки и ультрафильтрации.

Масс-спектрометрический анализ

Полученные пулы комплексов пептид-HLA были разделены в соответствии с их гидрофобностью обратноточной хроматографией (nanoAcquity UPLC system, Waters), и элюированные пептиды анализировали на гибридных масс-спектрометрах LTQ-velos и -fusion (ThermoElectron), снабженном источником ESI. Пулы пептидов наносили непосредственно на аналитическую микрокапиллярную колонку из плавленого кварца ($75\text{ мкм в/д} \times 250\text{ мм}$) с обращеннофазовым сорбентом $1,7\text{ мкм C18}$ (Waters) с применением скорости потока в 400 нл в минуту . Затем пептиды разделяли с использованием двухэтапного 180-минутного бинарного градиента от 10 до 33% растворителя В при скорости потока 300 нл в минуту . Для создания градиента использовали растворитель А (0,1% муравьиной кислоты в воде) и растворитель В (0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле). Позолоченный стеклянный капилляр (PicoTip, New Objective) использовали для введения в источник нано-ESI. Масс-спектрометры LTQ-Orbitrap работали в информационно-зависимом режиме с применением стратегии TOP5. Вкратце, цикл сканирования начинался с полного сканирования с высокой точностью масс на спектрометре Orbitrap ($R=30\,000$), за чем следовало сканирование МС/МС также на Orbitrap ($R=7500$) на 5 особенно многочисленных ионах-предшественниках с динамическим исключением отобранных ранее ионов. Тандемные масс-спектры интерпретировали при помощи программы SEQUEST с дополнительным контролем вручную. Идентифицированную пептидную последовательность подтверждали сравнением полученной картины фрагментации природного пептида с картиной фрагментации синтетического контрольного пептида с идентичной последовательностью.

Относительное количественное определение методом ЖХ/МС без изотопных меток проводили путем подсчета ионов, т.е. с помощью экстракции и анализа результатов ЖХ/МС (Mueller et al., 2007). Этот метод основан на предположении, что площадь пика ЖХ/МС сигнала пептида коррелирует с его концентрацией в образце. Извлеченные характеристики обрабатывали с помощью деконволюционного анализа состояния заряда и путем выравнивания времени удерживания (Mueller et al., 2008; Sturm et al., 2008). Наконец, все результаты спектров ЖХ/МС были сопоставлены методом перекрестных ссылок с результатами по идентификации последовательности, чтобы объединить количественные данные различных образцов и тканей в профили презентации пептидов. Количественные данные были нормализованы с применением двухуровневой системы в соответствии с центральной тенденцией с целью учета вариабельности внутри технических и биологических повторных измерений. Таким образом, каждый идентифицированный пептид может быть ассоциирован с количественными данными, позволяющими провести относительную количественную оценку образцов и тканей. Кроме того, все количественные данные, полученные для пептидов-кандидатов, были проконтролированы вручную в целях обеспечения взаимосогласованности данных и для проверки точности автоматического метода анализа. Для каждого пептида был рассчитан профиль презентации, показывающий средний уровень презентации в образце, а также вариабельность репликатов. В профиле сравниваются образцы раковой ткани с фоновым уровнем образцов нормальной ткани. Профили презентации типичных пептидов, презентуемых в избытке, показаны на фиг. 1. Сводка данных презентации пептидов среди различных видов тканей представлен в табл. 4 для выбранных пептидов.

Таблица 4. Сводка данных презентации выбранных пептидов среди различных видов тканей. Пептид рассматривали как представляющий интерес в одном из видов ткани, если он презентировался в избытке на раковых образцах этого вида ткани по сравнению с нормальными тканями. MEL=меланома (МЕЛ), BRCA=рак молочной железы (ПМЖ), OSCAR=карцинома пищевода (ПП). BPH (РПРЖ) включает как доброкачественную гиперплазию предстательной железы, так и рак поджелудочной железы.

SEQ ID NO.	Последовательность	Виды опухолей, представляющие особый интерес
1	KLQEKIQEL	GB,GC,NSCLC,HCC,OC,RCC,CRC,PC, OSCAR
2	SVLEKEIYSI	NSCLC,HCC,BPH,OC,CRC,PC
3	RVIDDSLVLGV	NSCLC,HCC,OC,MEL,CRC,PC, OSCAR
4	VLFGELPAL	GB,NSCLC,BRCA,RCC,PC, OC, PC
5	GLVDIMVHL	NSCLC,RCC, OC
7	ALLQALMEL	GC,NSCLC,RCC,CRC,PC
8	ALSSSQAEV	GB,NSCLC,OC,CRC,PC
9	SLITGQDLLSV	NSCLC,BPH,OC,MEL,PC, OSCAR
10	QLIEKNWLL	NSCLC,OC,CRC,PC, HCC, CLL, OSCAR
11	LLDPKTIFL	NSCLC,HCC,RCC,CRC
12	RLLDPKTIFL	NSCLC,RCC
13	RLHDENILL	GB,GC,NSCLC,HCC,BPH,OC,RCC,CRC,PC, OSCAR
14	YTFSGDVQL	GC,NSCLC,CRC,PC, OSCAR
15	GLPSATTTV	GC, NSCLC, OC, PC
16	SLADLSLLL	NSCLC,HCC,PC
17	GLLPSAESIKL	NSCLC,BPH,OC, OSCAR
18	KTASINQNV	NSCLC,CRC,PC, OSCAR, OC
19	KVFELDLVTL	GC,NSCLC,CRC, OSCAR
21	YLMDDFSSL	PC, NSCLC
22	LMYPYIYHV	GB, NSCLC, OC, OSCAR
23	ALLSPLSLA	PC
24	KVWSDVTPL	PC, NSCLC
25	LLWGHPRVALA	CRC, PC, NSCLC
26	VLGKVAVV	HCC, MEL, OC, GB, GC, NSCLC
27	GLLGKVTSV	NSCLC,BRCA
29	KMISAIPTL	NSCLC,OC
34	TLNTLDINL	OC, PC
35	VIKGLEEI	GC,NSCLC, OSCAR
36	TVLQELINV	NSCLC,PC, OSCAR
37	QIVELIEKI	GC,NSCLC, OSCAR
39	YLEDGFAYV	GB,NSCLC,HCC,PC
40	KIWEELSVLEV	GC,NSCLC,HCC,MEL
43	LLIPFTIFM	NSCLC,MEL,CRC, OC

44	AVFNLVHV	GC,NSCLC,PC
46	ISLDEVAVSL	GB,NSCLC,HCC, OC
47	GLNGFNVLL	PC, OSCAR
48	KISDFGLATV	GB,NSCLC,PC, OSCAR
49	KLIGNIHGNEV	GB,NSCLC,OC
50	ILLSVLHQL	NSCLC,CRC
51	LDSEALLTL	GB,NSCLC,HCC
52	TIGIPFPNV	NSCLC,PC, OC
53	AQHLSTLLL	GC,NSCLC
54	YLVPGLVAA	NSCLC,OC
55	HLFDKIIKI	GC,CRC
56	VLQENSSDYQSNL	NSCLC,HCC
57	TLYPGRFDYV	NSCLC,PC
58	HLLGEGAFQV	NSCLC,PC
59	ALADGIKSFL	NSCLC,PC
60	YLFSQGLQGL	NSCLC,PC
61	ALYPKEITL	NSCLC,CRC
63	KLLPMVIQL	NSCLC,PC
65	SLSEKSPEV	NSCLC,OC, OSCAR, MEL
66	AMFPDTIPRV	NSCLC,OC
67	FLIENLLAA	GB,NSCLC
68	QLMNLIRSV	HCC,PC
69	LKVLKADVVL	GC,NSCLC
70	GLTEKTVLV	NSCLC,PC
71	HMSGKLTNV	NSCLC,PC
73	SVPKTLGV	GB,RCC
74	GLAFLPASV	GC,CRC
76	FTAEFLEKV	NSCLC,PC, GB, OSCAR
77	ALYGNVQQV	NSCLC,OC
82	ILAEPIYIRV	NSCLC,PC, OSCAR, OC
83	GLENPHL	NSCLC, OC
84	FLLEREQLL	NSCLC,MEL,RCC,CRC,PC
85	KLLDKPEQFL	NSCLC,OC,MEL,CRC
86	SLFSNIESV	NSCLC,BPH,CRC
88	LLLPLELSLA	GB,NSCLC,PC
89	SLAETIFIV	GC,NSCLC,OC
92	RLFEEVLGV	NSCLC,HCC,OC, OC

93	RLYGYFHDA	NSCLC,PC
94	YLDEVAFML	NSCLC,HCC, OC
95	KLIDEDEPLFL	NSCLC,OC
96	ALDTTRHEL	NSCLC,PC
97	KLFEKSTGL	NSCLC,CRC
98	FVQEKIPEL	GC,CRC
100	ALQSFEFRV	OC,RCC
101	SLLEVNEASSV	GC,CLL
102	GLYPVTLVGV	BPH,OC
114	LLFPSDVQTL	PC, OSCAR
116	ALLSSVAEA	NSCLC, OSCAR, OC
117	TLLEGISRA	NSCLC, OC
134	SLYKSFLQL	NSCLC, OSCAR, OC
137	KLIYKDLVSV	NSCLC, OC, PC
146	VVA AHLAGA	NSCLC, OSCAR, OC
158	YLDPLWHQL	PC, OC
165	SLLDYEVS	NSCLC, OSCAR, OC
166	LLGDSSFFL	NSCLC, HCC, OSCAR, OC, PC
170	FIAAVVEKV	NSCLC, OC
175	SLLDLVQSL	PC, OC
176	VQSGLRILL	NSCLC, OSCAR
184	ALDSTIAHL	NSCLC, OC
191	AAIEIFEKV	NSCLC, OSCAR, OC
203	FLFVDPVL	NSCLC, GC, OC
229	YLYELEHAL	NSCLC, OC
233	SLFESLEYL	NSCLC, OSCAR, OC
234	VLLNEILEQV	GC,NSCLC,HCC,OC,MEL,RCC,CRC,PC, OSCAR
235	SLLNQPKAV	GB,NSCLC,HCC,OC,MEL,CRC,PC, OSCAR
236	KMSELQTYV	GB,NSCLC,HCC,OC,MEL,CRC,PC
237	ALLEQTGDMSL	NSCLC,OC,MEL,CRC
239	VIIKGLEEITV	GC,NSCLC,HCC,OC,MEL,CRC,PC
241	KQFEGTVEI	NSCLC,MCC,OC,CRC,PC, OSCAR
242	KLQEEIPVL	GB,NSCLC,CRC
243	GLAEFQENV	GB,NSCLC,HCC,OC,CRC,PC, OSCAR
244	NVAEIVIH	GC,NSCLC
246	ALAGIVTNV	NSCLC,HCC,OC,MEL,RCC
247	NLLIDDKGTIKL	NSCLC,HCC,MEL,CRC,PC

248	VLMQDSRLYL	NSCLC,CRC,PC
251	LLWGNLPEI	NSCLC,MEL,CRC,PC, OC
252	SLMEKNQSL	NSCLC,OC,CRC, OSCAR, RCC
253	KLLAVIHEL	NSCLC,RCC,CRC,PC, OSCAR, OC
254	ALGDKFLLRV	NSCLC,HCC,MEL, OC
255	FLMKNSDLYGA	NSCLC,HCC,MEL,PC, OSCAR
256	FLNDIFERI	NSCLC,HCC,CLL, OC
257	KLIDHQGLYL	NSCLC,OC,CRC, OSCAR
258	QLVQRVASV	NSCLC,OC
259	GPGIFFPPPPQP	NSCLC,BPH, OSCAR, OC
260	ALNESLVEC	NSCLC,MEL, OSCAR, OC
261	GLAALAVHL	NSCLC,OC,MEL,CRC,PC, OSCAR
262	LLLEAVWHL	NSCLC,CRC
263	SIIEYLPTL	NSCLC,MEL,PC
264	TLHDQVHLL	NSCLC,BPH,OC
265	FLLDKPQDLSI	NSCLC,OC,RCC
266	FLLDKPQDL	RCC, OC
267	YLLDMPLWYL	NSCLC,RCC,CRC, OC, MEL
269	GLLDCPIFL	NSCLC,CRC, OSCAR, OC
270	TLLTFFHEL	GB,PC
271	VLIEYNFSI	NSCLC, OC
272	FVMEGEPPKL	NSCLC,OC
273	SLNKQIETV	NSCLC,OC
274	TLYNPERTITV	NSCLC, PC, HCC
277	KLQEELNKV	HCC, OC
281	LLLESDPKVYSL	PC, OC
284	KLMDPGSLPPL	NSCLC, OC
287	KIQEILTQV	GB,GC,NSCLC,HCC,CLL,OC,MEL,RCC,CRC,PC, OSCAR
288	SLYKGLLSV	GB,NSCLC,HCC,BPH,OC,RCC,CRC,PC, OSCAR

Таблица 4В. Сводка данных презентации выбранных пептидов среди различных видов тканей

SEQ ID NO.	Последовательность	Дополнительные виды опухолей, представляющие особый интерес
1	KLQEKIQL	MEL, AML, NHL
2	SVLEKEIYSI	GC, CLL, OSCAR, SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML, NHL
3	RVIDDSLTVGV	UBC
4	VLFGELPAL	SCLC, UBC, UTC
5	GLVDIMVHL	SCLC, UBC, BRCA, MEL, PC
6	FLNAIETAL	RCC
7	ALLQALMEL	CLL, OSCAR, OC, SCLC, UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML, NHL
8	ALSSSQAQEV	BPH, OSCAR, SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML, NHL
9	SLITGQDLSV	SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC
10	QLIEKNWLL	SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML, NHL
11	LLDPKTIFL	GBC_CCC
13	RLHDENILL	SCLC, UBC, UTC, BRCA, MEL, AML, NHL
14	YTFSGDVQL	SCLC, UBC, UTC, GBC_CCC, MEL
15	GLPSATTTV	UBC, UTC, MEL
16	SLADLSLLL	GB, GC, BPH, CLL, OSCAR, OC, SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL, RCC, CRC, AML, NHL
17	GLLPSAESIKL	UBC
18	KTASINQNV	SCLC, UBC, UTC, MEL
19	KVFELDLVTL	AML, NHL
21	YLMDDFSSL	OSCAR, OC, SCLC, UBC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML, NHL
22	LMYPYIYHV	HCC, CLL, SCLC, UBC, BRCA, GBC_CCC, MEL, CRC, NHL
24	KVWSDVTPL	BRCA
26	VLDGKVAVV	CLL, UTC, NHL
27	GLLGKVTSTV	SCLC, UBC
28	IKVTDPQLLEL	NSCLC, MEL

29	KMISAIPTL	UTC
30	IITEVITRL	OC, UTC
31	GLLETTGLLAT	OC
33	TLDRNSLYV	OC, UTC
34	TLNTLDINL	UTC
35	VIKGLEEI	OC
36	TVLQELINV	UBC, UTC, MEL, CRC, AML, NHL
38	VLQQESNFL	AML
39	YLEDGFAYV	CLL, UBC, UTC, MEL, NHL
40	KIWEELSVLEV	SCLC, UBC
41	IVTEIISEI	CLL, SCLC, UTC, GBC_CCC, AML, NHL
43	LLIPFTIFM	SCLC, GBC_CCC, NHL
46	ISLDEVAVSL	BRCA
47	GLNGFNVLL	SCLC, UTC, GBC_CCC, MEL, CRC, AML, NHL
48	KISDFGLATV	OC, MEL
51	LDSEALLTL	BRCA
52	TIGIPFPNV	MEL, NHL
53	AQHLSTLLL	SCLC, GBC_CCC
56	VLQENSSDYQSNL	UTC
57	TLYPGRFDYV	OSCAR, UBC
59	ALADGIKSFL	BRCA, MEL
64	SLYAGSNNQV	NSCLC
65	SLSEKSPEV	HCC, SCLC, UBC, UTC, BRCA, NHL
67	FLIENLLAA	UTC
68	QLMNLIRSV	UBC, AML
70	GLTEKTVLV	CRC, AML, NHL
75	ALLDGALQL	GC, CRC
76	FTAEFLEKV	UBC, MEL, AML, NHL
77	ALYGNVQQV	BRCA, NHL
78	LFQSRIAGV	BPH
80	VLTGQVHEL	GB
83	GLLENSPHL	BRCA, MEL, AML, NHL
84	FLLEREQLL	CLL, UBC, UTC, BRCA, AML, NHL
85	KLLDKPEQFL	NHL
86	SLFSNIESV	SCLC, BRCA, GBC_CCC
87	KLLSLLEEA	NSCLC, BPH
89	SLAETIFIV	SCLC, GBC_CCC, RCC, NHL
90	AILNVDEKNQV	OC
91	LLPSIFLMV	OC
92	RLFEEVLGV	OSCAR, SCLC, UBC, BRCA, AML
94	YLDEVAFML	UBC, BRCA, GBC_CCC

95	KLIDEDEPLFL	SCLC, UTC, GBC_CCC
96	ALDTTRHEL	OSCAR, UBC, UTC
98	FVQEKIPEL	GBC_CCC
99	TLFGIQLTEA	GC, GBC_CCC
101	SLLEVNEASSV	NHL
102	GLYPVTLVGV	SCLC, BRCA, AML
103	YLADTVQKL	NSCLC
104	DLPTQEPALGTT	BPH
106	VLLGSVVIFA	BPH
108	FIANLPPELKA	BPH
109	ILGSFELQL	BPH
110	QIQGQVSEV	BPH
112	ILAQDVAQL	MEL, AML, NHL
113	FLFLKEVKV	CRC
116	ALLSSVAEA	SCLC, BRCA, CRC
117	TLLEGISRA	BRCA
118	IAYNPNGNAL	NSCLC, CLL, AML
119	SLIEESEEL	OC, UTC
121	ALYVQAPTV	NSCLC, UTC, NHL
122	SIIDTELKV	AML
124	ALLRLFTI	NSCLC
128	SILTNISEV	NSCLC
129	KMASKVTQV	HCC
130	QLYGSAILL	HCC
132	ALLNNVIEV	HCC, BRCA
133	FLDGRPLTL	UTC, MEL
135	HLDTVKIEV	GB
136	LLWDAPAKC	CRC
139	IILENIQSL	UBC, BRCA, AML
140	FLDSQITTV	MEL
142	LLDAAHASI	NSCLC
143	MLWESIMRV	NSCLC, UTC
144	FLISQTPLL	NSCLC, SCLC, UBC
145	ALEEKLENV	NSCLC
146	VVAAHLAGA	GC, MEL
147	GLLSALENV	CLL, NHL
148	YLILSSHQL	CLL, NHL
150	VLLDMVHSL	HCC, UTC
151	DISKRIQSL	NSCLC
152	ILVTSIFFL	CLL, NHL
153	KLVELEHTL	GC, NSCLC, OSCAR

154	AIKEIQTIV	GB, NSCLC, HCC, UBC, MEL
155	TLDSYLKAV	OC, BRCA
156	VILTSSPFL	CLL, BRCA, AML, NHL
157	ILQDGGQFLV	HCC, UBC
158	YLDPLWHQL	CLL, MEL, NHL
159	QLGPVPVTI	UBC, RCC, NHL
160	TLQEWLTEV	NSCLC, GBC_CCC
161	NLLDENVCL	CRC
162	GLLGNNLLTSL	NSCLC
163	GLEERLYTA	NSCLC, CLL, AML, NHL
164	MLIIRVPSV	NSCLC
165	SLLDYEVS	GBC_CCC
166	LLGDSSFFL	CLL, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML
167	LVVDEGSLVSV	OC, SCLC
168	VIFEGEPMYL	NSCLC, BRCA, NHL
169	ALADLSVAV	NSCLC, HCC, OSCAR, OC, UBC, UTC, GBC_CCC, MEL, AML
170	FIAAVVEKV	SCLC, NHL
171	LLLLDVPTA	NSCLC, UTC, BRCA, CRC, NHL
172	SLYLQMNSLRTE	NSCLC
173	RLIDIYKNV	OC
174	ALYSGDLHAA	HCC
175	SLLDLVQSL	BRCA, AML, NHL
177	ALINVLNAL	AML
179	TLGEIIKGV	NSCLC
180	RLYEEEIRI	NSCLC
181	LLWAPTAQA	GB, NSCLC, RCC, CRC
182	GLQDGFQITV	GC
183	ALSILPYL	NSCLC, SCLC, UTC, BRCA, CRC, AML, NHL
184	ALDSTIAHL	UTC, MEL
185	TLYQGLPAEV	GC, NSCLC, HCC, OSCAR, OC, UBC, UTC, BRCA, RCC, CRC
186	SLLSLESRL	GC
187	SILKEDPFL	NSCLC
188	VLGEEQEGV	NSCLC
189	MAVSDLLIL	GB
190	SLSTELFKV	HCC
192	TLLPSSGLVTL	BRCA
193	ALFHMNILL	NSCLC
194	KLLEEVQLL	NSCLC
195	VIIQNLPAL	CRC
196	TLHQWIYYL	CRC

198	ILTNKVSV	OC
199	SVADLAHVL	GC
200	IMPTFDLTKV	HCC
201	LLFSLCEA	BPH
203	FLFVDPELV	CRC, AML, NHL
204	SEWGSPHAAVP	PC
205	LAFGYDDEL	HCC
206	GLDAFRIFL	CRC
207	KLFETVEEL	GB
208	HLNNDRNPL	BPH
210	GLAGDNIYL	RCC
211	LLTTVLINA	RCC
212	MTLSEIHAV	CRC
213	ILAVDGVLSV	NSCLC, BRCA, MEL
214	ALFETLIQL	HCC
215	QIADIVTSV	HCC
216	ALSTVTPRI	HCC
217	LLWPSSVPA	GB, MEL, AML
220	ALSELERV	BPH, UTC
221	IMLNSVEEI	BPH, NHL
222	LLTGVFAQL	CLL, UTC, BRCA, CRC, NHL
223	ALHPVQFYL	OC, CRC
224	LLFDWSGTGRADA	GBC_CCC
225	FLPQPVPLSV	CLL, MEL, NHL
226	SLAGNLQEL	GB
227	SEMEELPSV	HCC
228	SLELDGINLRL	NSCLC
230	KLLNMIFSI	BPH
231	LLDDIFIRL	MEL
233	SLFESLEYL	UTC, RCC
234	VLLNEILEQV	CLL, SCLC, UBC, UTC, BRCA, AML, NHL
235	SLLNQPKAV	SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, AML, NHL
236	KMSELQTYV	GC, BPH, CLL, OSCAR, SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, RCC, AML, NHL
237	ALLEQTGDMSL	SCLC, UBC, BRCA, AML, NHL
238	HLQEKLQSL	HCC
239	VIKGLEEITV	CLL, SCLC, UBC, UTC, AML, NHL
240	SVQENIQK	RCC, NHL
241	KQFEGTVEI	CLL, NHL
242	KLQEEIPVL	BRCA, MEL, NHL
243	GLAEFQENV	CLL, SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML, NHL

244	NVAEIVIH	GB
245	ALLEEEGV	NSCLC, UBC, GBC_CCC
246	ALAGIVTNV	GB, CLL, SCLC, BRCA, GBC_CCC, AML
248	VLMQDSRLYL	CLL, UBC, UTC, AML, NHL
251	LLWGNLPEI	CLL, SCLC, UTC, GBC_CCC, AML, NHL
252	SLMEKNQSL	AML
253	KLLAVIHEL	UBC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML, NHL
254	ALGDKFLLRV	NHL
255	FLMKNSDLYGA	UBC, UTC, GBC_CCC, AML, NHL
256	FLNDIFERI	UTC, MEL, AML, NHL
258	QLVQRVASV	UBC, NHL
260	ALNESLVEC	SCLC, UBC, UTC, CRC, AML, NHL
261	GLAALAVHL	GC, CLL, SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, AML, NHL
262	LLLEAVVHL	BRCA, NHL
263	SIIEYLPTL	CLL, OSCAR, OC, SCLC, UBC, GBC_CCC, AML, NHL
264	TLHDQVHLL	UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL
265	FLLDKPQDLSI	GBC_CCC
267	YLLDMPLWYL	AML, NHL
269	GLLDCPIFL	CLL, UTC, AML, NHL
270	TLLTFFHEL	UTC, GBC_CCC, AML, NHL
271	VLIEYNFSI	CLL, SCLC, MEL, AML, NHL
272	FVMEGEPPKL	CLL, UTC
273	SLNKQIETV	AML
275	AVPPPPSSV	NSCLC, HCC
276	RMPTVLQCV	BPH
277	KLQEELNKV	NSCLC, OSCAR, UBC, BRCA, NHL
279	VLMDEGAVLTL	CLL, CRC, NHL
280	HLWGHALFL	HCC
281	LLLESDPKVYSL	OSCAR, SCLC
282	SLYALHVKA	OC, SCLC
283	ALSELLQVQV	NSCLC, HCC, OC, SCLC, UTC, MEL, CRC, AML, NHL
285	MLLDTVQKV	NSCLC
286	FLTEMVHFI	NSCLC, CLL, SCLC, UBC, NHL

GB=глиобластома (ГБ), BRCA=рак молочной железы (ПМЖ), CRC=колоректальный рак (КРК), RCC=почечноклеточная карцинома (ПКК), CLL=хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), HCC=гепатоклеточная карцинома (ГКК), NSCLC=немелкоклеточный рак легких (НМРЛ), SCLC=мелкоклеточный рак легких (МРЛ), NHL=неходжкинская лимфома (НХЛ), AML=острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), OC=рак яичника (РЯ), PC=рак поджелудочной железы (РПЖ), BPH=рак предстательной железы и доброкачественная гиперплазия предстательной железы (РПРЖ), OSCAR=рак пищевода, в том числе желудочно-пищеводное соединение (ПП), GBC_CCC=аденокарцинома желчного пузыря и холангиокарцинома (РЖП_ХК), MEL=меланома (МЕЛ), GC=рак желудка (РЖ), UBC=рак мочевого пузыря (РМП), UTC=рак матки (РМ).

Пример 2. Профили экспрессии генов, кодирующих пептиды по изобретению

Избыточной презентации или специфической презентации пептида на опухолевых клетках по сравнению с нормальными клетками достаточно для его пригодности в иммунотерапии, и некоторые пептиды являются опухолеспецифическими, несмотря на присутствие их исходных белков также и в нормальных тканях. Тем не менее, выявление профилей экспрессии мРНК привносит дополнительный уровень безопасности при отборе пептидных мишеней для иммунотерапии. В особенности в случае терапевтических методов с высокой степенью риска для безопасности, таких как ТКР с созревшей аффинностью, идеальный целевой пептид будет получен из белка, являющегося уникальным для опухоли и не встречающегося на нормальных тканях. Для данного изобретения экспрессия в нормальных тканях всех исходных генов минимальна, как было показано, руководствуясь данными описанного ранее банка данных экспрессии РНК, охватывающего около 3000 образцов нормальных тканей. Дополнительные анализы РНК нормальных и опухолевых тканей были добавлены в случае некоторых видов рака (ГКК, КРК, ГБ, РЖ, НМРЛ, РПЖ, ПКК, ДГПРЖ/РПРЖ) для оценки охвата целевых мишеней в популяции пациентов, страдающих от соответствующего вида рака.

Источники и приготовление РНК

Хирургически удаленные тканевые препараты были предоставлены различными организациями, которые перечислены выше (см. пример 1) после получения письменной формы информированного согласия от каждого пациента. Препараты опухолевой ткани были мгновенно заморожены после операции и впоследствии гомогенизированы с помощью ступки и пестика в жидком азоте. Суммарная РНК была приготовлена из данных образцов с использованием реагента TRI (Ambion, Дармштадт, Германия) с по-

следующей очисткой на RNeasy (QIAGEN, Хильден, Германия); оба метода осуществлялись в соответствии с указаниями производителей.

Суммарная РНК здоровых человеческих тканей была куплена (Ambion, Хантингтон, Великобритания; Clontech, Гейдельберг, Германия; Stratagene, Амстердам, Нидерланды; BioChain, Хейард, Калифорния, США). РНК нескольких индивидов (от 2 до 123 индивидов) была смешана таким образом, что РНК каждого индивида имела равный вес. Качество и количество всех образцов РНК оценивали на биоанализаторе Agilent 2100 (Agilent, Вальдбронн, Германия) с использованием набора RNA 6000 Pico LabChip Kit (Agilent).

Суммарная РНК здоровых человеческих тканей для экспериментов RNASeq была получена из Asterand (Детройт, Мичиган, США и Ройстон, Хартфордшир, Великобритания), BioCat GmbH (Гейдельберг, Германия), BioServe (Белтсвилль, Мэриленд, США), Capital BioScience Inc. (Роквилль, Мэриленд, США), Geneticist Inc. (Глендейл, Калифорния, США), Istituto Nazionale Tumori "Pascale" (Неаполь, Италия), ProteoGenex Inc. (Кальвер-Сити, Калифорния, США), Университетской клиники г. Гейдельберг (Гейдельберг, Германия)

Суммарная РНК опухолевых тканей для экспериментов RNASeq была получена из Asterand (Детройт, Мичиган, США и Ройстон, Хартфордшир, Великобритания), Bio-Options Inc. (Бри, Калифорния, США), BioServe (Белтсвилль, Мэриленд, США), Geneticist Inc. (Глендейл, Калифорния, США), ProteoGenex Inc. (Кальвер-Сити, Калифорния, США), Tissue Solutions Ltd (Глазго, Великобритания), Университетской клиники г. Бонн (Бонн, Германия), Университетской клиники г. Гейдельберг (Гейдельберг, Германия), Университетской клиники г. Гейдельберг (Гейдельберг, Германия)

Эксперименты с микрочипами

Охват оценивали анализом профилей экспрессии РНК (микрочипы Affymetrix) 30 ГБ, 16 КРК, 56 ПКК, 12 ГКК, 38 НМРЛ, 11 РПЖ, 34 РЖ и 20 образцов рака предстательной железы.

Анализ экспрессии генов всех образцов РНК из опухолевой и нормальной ткани был произведен с помощью олигонуклеотидных микрочипов Affymetrix Human Genome (HG) U133A или HG-U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Санта Клара, Калифорния, США). Все этапы были выполнены в соответствии с руководством Affymetrix. Вкратце, двухнитевую кДНК синтезировали из 5-8 мкг суммарной РНК с использованием Superscript RTII (Invitrogen) и олиго-dT-T7 праймера (MWG Biotech, Эберсберг, Германия), как описывается в руководстве. Транскрипцию *in vitro* производили с использованием набора для мечения РНК-транскриптов BioArray High Yield RNA Transcript Labelling Kit (ENZO Diagnostics, Inc., Фармингдейл, Нью-Йорк, США) для чипов U133A или набора GeneChip IVT Labelling Kit (Affymetrix) для чипов U133 Plus 2.0 с последующей фрагментацией, гибридизацией кРНК и окрашиванием стрептавидин-фикоэритрином и биотинилированным анти-стрептавидиновым антителом (Molecular Probes, Лейден, Нидерланды). Изображения сканировали на Agilent 2500A GeneArray Scanner (U133A) или Affymetrix Gene-Chip Scanner 3000 (U133 Plus 2.0), а данные анализировали в программе GCOS (Affymetrix) с использованием настроек по умолчанию для всех параметров. Для нормализации использовались 100 служебных генов, предоставленных Affymetrix. Относительные значения экспрессии были подсчитаны из отношений логарифмов зарегистрированных сигналов, полученных компьютерной программой, а значение для образца нормальной почки было произвольно задано значением 1,0. Типичные профили экспрессии исходных генов, предложенных в настоящем изобретении, которые в высокой степени экспрессированы в избытке или исключительно экспрессированы в клетках ГКК, КРК, ГБ, РЖ, НМРЛ, РПЖ, ПКК или ДГПРЖ/РПРЖ, представлены на фиг. 2. Сводка данных по охвату выбранных генов представлен в табл. 5.

Таблица 5А. Целевой охват для исходных генов выбранных пептидов. Избыточной считали экспрессию на опухоли, которая была в 1,5 раза выше в сравнении с соответствующей нормальной тканью, демонстрировавшей наивысшую экспрессию гена. Избыточная экспрессия <19%=I, 20-49%=II, 50-69%=III, >70%=IV. Если пептид мог быть получен из нескольких исходных генов, решающее значение имел ген с наименьшим покрытием.

SEQ ID NO.	Последовательность	ГБ (%)	КРК (%)	ПКК (%)	ГКК (%)	НМРП (%)	РГЖ (%)	ДГПРЖРПРЖ (%)	РЖ (%)	Идентификатор гена	Официальный символ гена
116	ALLSSVAEA	I	II	I	I	II	I	I	I	9048	ARTN
263	SIIEYLPTL	I	II	I	I	I	I	I	I	79915	ATAD5
93	RLYGYFHDA	II	III	I	II	II	II	I	III	6790	AURKA
27	GLLGKVTSTV	I	I	I	I	II	I	I	I	51297	BPIFA1
28	IKVTDQPQLLEL	I	I	I	I	II	I	I	I	51297	BPIFA1
62	SLVENIHVL	II	III	II	I	III	III	I	III	675	BRCA2
241	KQFEGTVEI	II	III	II	I	III	III	I	III	675	BRCA2
52	TIGIPFPNV	III	I	I	II	II	I	I	II	83990	BRIP1
58	HLLGEGAFQV	III	III	I	I	III	II	I	III	699	BUB1
117	TLLEGISRA	I	I	I	I	II	II	I	I	26256	CABYR
94	YLDEVAFML	I	I	I	I	I	II	I	I	1238	CCBP2
103	YLADTVQKL	II	I	I	I	I	I	I	I	10052676 1, 54937	CCDC169- SOHLH2,SOHLH2
79	TVLEEIGNRV	II	IV	I	I	II	I	I	II	9133	CCNB2
247	NLLIDDKGTIKL	IV	IV	II	II	IV	III	I	IV	983	CDK1
248	VLMQDSRLYL	IV	IV	II	II	IV	III	I	IV	983	CDK1
249	YLYQILQGI	IV	IV	II	II	IV	III	I	IV	983	CDK1
250	LMQDSRLYL	IV	IV	II	II	IV	III	I	IV	983	CDK1
1	KLQEKIQEL	III	II	I	I	II	I	I	II	1062	CENPE
242	KLQEEIPVL	III	II	I	I	II	I	I	II	1062	CENPE
19	KVFELDLVTL	IV	III	I	I	I	I	I	I	1063	CENPF
20	ALVEKGEFAL	IV	III	I	I	I	I	I	I	1063	CENPF
236	KMSELQTYV	IV	III	I	I	I	I	I	I	1063	CENPF
237	ALLEQTGDMSL	IV	III	I	I	I	I	I	I	1063	CENPF
238	HLQEKLQSL	IV	III	I	I	I	I	I	I	1063	CENPF
60	YLFSQLQGL	III	IV	I	III	III	II	I	III	2491	CENPI
260	ALNESLVEC	I	III	I	I	II	I	I	II	55165	CEP55
48	KISDFGLATV	IV	IV	II	II	IV	II	I	IV	1111	CHEK1
49	KLIGNIHGNEV	I	I	I	I	I	II	I	I	8532	CPZ
50	ILLSVLHQL	I	I	I	I	I	II	I	I	8532	CPZ
284	KLMDPGSLPPL	I	IV	I	I	II	I	I	II	2118	ETV4
261	GLAALAVHL	I	III	I	II	II	I	I	I	2175	FANCA

262	LLLEAVVHL	I	III	I	II	II	I	I	I	2175	FANCA
270	TLLTFFHEL	II	III	I	I	II	I	I	II	55215	FANCI
271	VLIEYNFSI	II	III	I	I	II	I	I	II	55215	FANCI
11	LLDPKTIFL	I	I	II	I	I	I	I	I	26762	HAVCR1
12	RLLDPKTIFL	I	I	II	I	I	I	I	I	26762	HAVCR1
111	AQLEGKLVSI	I	III	I	I	II	I	I	III	3161	HMMR
277	KLQEELNKV	I	III	I	I	II	I	I	III	3161	HMMR
67	FLIENLLAA	I	I	I	II	I	I	I	I	3166	HMX1
56	VLQENSSDYQS NL	II	III	I	I	I	I	I	I	3188	HNRNPH2
89	SLAETIFIV	I	I	I	I	II	I	I	I	3359	HTR3A
90	AILNVDEKNQV	I	I	I	I	II	I	I	I	3359	HTR3A
91	LLPSIFLMV	I	I	I	I	II	I	I	I	3359	HTR3A
287	KIQEILTQV	IV	II	II	III	IV	IV	I	II	10643	IGF2BP3
97	KLFEKSTGL	IV	IV	II	II	I	II	III	II	23421	ITGB3BP
35	VIKGLEEI	I	II	I	I	I	I	I	I	3832	KIF11
36	TVLQELINV	I	II	I	I	I	I	I	I	3832	KIF11
37	QIVELIEKI	I	II	I	I	I	I	I	I	3832	KIF11
239	VIKGLEEITV	I	II	I	I	I	I	I	I	3832	KIF11
240	SVQENIQQK	I	II	I	I	I	I	I	I	3832	KIF11
10	QLIEKNWLL	IV	IV	I	II	III	II	I	IV	56992	KIF15
112	ILAQDVAQL	III	IV	I	I	II	II	I	III	24137	KIF4A
70	GLTEKTVLV	III	IV	I	I	II	II	I	III	24,137,28 5,643	KIF4A, KIF4B
252	SLMEKNQSL	III	IV	I	I	II	II	I	III	24,137,28 5,643	KIF4A, KIF4B
104	DLPTQEPALGTT	I	I	I	I	I	I	IV	I	354	KLK3
118	IAYNPNGNAL	I	I	I	I	I	II	I	I	3824	KLRD1
113	FLFLKEVKV	I	II	I	I	I	I	I	I	54596	L1TD1
279	VLMDEGAVLTL	I	II	I	I	I	I	I	I	54596	L1TD1
119	SLIEESEEL	I	II	I	I	I	I	I	I	284217	LAMA1
105	AMLASQTEA	II	I	I	II	I	IV	I	I	4295	MLN
106	VLLGSVVIFA	I	I	I	I	I	I	IV	II	4477	MSMB
29	KMISAIPTL	I	I	I	I	III	II	II	I	94025	MUC16
30	IITEVITRL	I	I	I	I	III	II	II	I	94025	MUC16
31	GLLETTGLLAT	I	I	I	I	III	II	II	I	94025	MUC16
32	VVMVLVLM	I	I	I	I	III	II	II	I	94025	MUC16
33	TLDRNSLYV	I	I	I	I	III	II	II	I	94025	MUC16
34	TLNTLDINL	I	I	I	I	III	II	II	I	94025	MUC16
41	IVTEIIEI	III	IV	I	I	III	I	I	III	64151	NCAPG
42	KQMSISTGL	III	IV	I	I	III	I	I	III	64151	NCAPG
234	VLLNEILEQV	III	IV	I	I	III	I	I	III	64151	NCAPG
285	MLLDTVQKV	I	II	I	I	I	I	I	I	54892	NCAPG2
114	LLFPSDVQTL	II	III	I	I	III	I	I	III	23397	NCAPH
107	RVLPQGAVTGV	I	III	I	I	I	I	I	I	55247	NEIL3
81	ILAEPIYI	I	I	I	I	II	II	II	II	55655	NLRP2
82	ILAEPIYIRV	I	I	I	I	II	II	II	II	55655	NLRP2
115	ILHGEVNVK	I	II	I	I	I	I	I	I	54830	NUP62CL
39	YLEDGFAYV	II	IV	I	I	III	II	IV	IV	5558	PRIM2
83	GLLENSPHL	III	II	II	II	I	III	I	II	25788	RAD54B
253	KLLAVIHEL	III	II	II	II	I	III	I	II	25788	RAD54B
288	SLYKGLLSV	III	II	II	II	I	III	I	II	25788	RAD54B
108	FIANLPPELKA	I	II	I	I	I	I	IV	I	6013	RLN1
13	RLHDENILL	III	II	II	I	I	I	I	I	23322	RPGRIP1L
120	LQLJPLKGLSL	II	IV	I	II	III	II	I	III	6241	RRM2
76	FTAEFLEKV	III	I	I	I	I	II	I	I	79801	SHCBP1
255	FLMKNSDLYGA	III	I	I	I	I	II	I	I	79801	SHCBP1
74	GLAFLPASV	I	II	I	I	I	I	I	I	6570	SLC18A1
75	ALLDGALQL	I	II	I	I	I	I	I	I	6570	SLC18A1
243	GLAEFQENV	II	I	I	I	II	II	I	II	57405	SPC25
281	LLLESDPKVYSL	I	III	I	I	I	I	I	I	6491	STIL
109	ILGSFELQL	I	I	I	I	I	I	IV	I	7047	TGM4
110	QIQGQVSEV	I	I	I	I	I	I	IV	I	7047	TGM4
267	YLLDMPWLWYL	IV	IV	II	II	IV	III	I	IV	7153	TOP2A
268	SLDKDIVAL	IV	IV	II	II	IV	III	I	IV	7153	TOP2A

121	ALYVQAPTV	IV	IV	II	II	IV	IV	I	IV	9319	TRIP13
122	SIIDTELKV	IV	IV	II	II	IV	IV	I	IV	9319	TRIP13
123	QTAPEEAFIKL	IV	II	III	III	III	II	IV	III	15,073,79 2,104	TTC30B, TTC30A
124	ALLRLFTI	III	IV	II	II	IV	IV	I	IV	11169	WDHD1
125	AALEVLAEV	I	III	I	I	I	I	I	I	11130	ZWINT
126	QLREAFEQL	I	III	I	I	I	I	I	I	11130	ZWINT

Эксперименты RNAseq

Анализ экспрессии гена в образцах РНК опухолевой и нормальной ткани проводили способом секвенирования следующего поколения (RNAseq) лабораторией CeGaT (Тюбинген, Германия). Вкратце, библиотеки секвенирования подготавливали при использовании набора реактивов Illumina HiSeq v4 согласно протоколу производителя (Illumina Inc., Сан-Диего, Калифорния, США), куда входит фрагментация РНК, синтез кДНК и добавление адаптеров секвенирования. Библиотеки, полученные из многочисленных образцов, смешивали в эквимолярном соотношении и секвенировали на системе компании Illumina HiSeq 2500 согласно инструкциям производителя, получая одиночные риды длиной 50 пар оснований. Произведенные риды картируют на человеческий геном (GRCh38) с помощью программного обеспечения STAR. Данные по экспрессии представляются на уровне транскриптов в виде RPKM (число ридов на тысячу пар нуклеотидов, отнесенное на миллион картированных ридов с помощью программного обеспечения Cufflinks) и на уровне экзонов (общее число ридов, получаемых с помощью программного обеспечения Bedtools), на основании аннотаций банка данных последовательностей ensembl (Ensembl77). Для получения значений RPKM риды экзонов нормализованы по длине экзона и размеру выравнивания.

Примеры профилей экспрессии исходных генов настоящего изобретения, которые в высокой степени экспрессированы в избытке или исключительно экспрессированы в НХЛ, РМЖ, РЖП, ХК, МЕЛ, РЯ, РП, МРЛ, РМП, РЭМ, представлены на фиг. 2F-H. Показатели экспрессии других отдельных генов показаны в табл. 5B.

Таблица 5B: Целевой охват для исходных генов выбранных пептидов. Избыточной считали экспрессию на опухоли, которая была в 1,5 раза выше в сравнении с соответствующей нормальной тканью, демонстрировавшей наивысшую экспрессию гена. Избыточная экспрессия <19%=I, 20-49%=II, 50-69%=III, >70%=IV. Если пептид мог быть получен из нескольких исходных генов, решающее значение имел ген с наименьшим покрытием. Фоновый уровень включал следующие релевантные нормальные ткани: жировая ткань, надпочечник, артерия, костный мозг, головной мозг, хрящевая ткань, толстая кишка, пищевод, желчный пузырь, сердце, почка, печень, легкие, лимфатический узел, поджелудочная железа, гипофиз, прямая кишка, скелетная мышца, кожа, тонкая кишка, селезенка, желудок, вилочковая железа, щитовидная железа, трахея, мочевой пузырь и вена. В случае, если в наличии имелись данные для нескольких образцов одного и того же вида ткани, для расчетов использовали среднее арифметическое всех соответствующих образцов. ОМЛ=острый миелоидный лейкоз, НХЛ=неходжкинская лимфома, РМЖ=рак молочной железы, ХЛЛ=хронический лимфоцитарный лейкоз, РЖП_ХК=аденокарцинома желчного пузыря и холангиокарцинома, МЕЛ=меланома, РЯ=рак яичника, РП=рак пищевода, в том числе желудочно-пищеводное соединение, МРЛ=мелкоклеточный рак легких, РМП=рак мочевого пузыря, РМ=рак матки.

SEQ ID NO.	Последовательность	ОМЛ (%)	НХЛ (%)	РМЖ (%)	ХЛЛ (%)	РЖП_ХК (%)	МЕЛ (%)	РЯ (%)	ПКРП (%)	МРЛ (%)	РМП (%)	РМ (%)
1	KLQEKIQEL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I

2	SVLEKEIYSI	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
3	RVIDDSLVLGV	I	II	I	I	I	I	I	I	II	I	I
4	VLFGEPLAL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
5	GLVDIMVHL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
7	ALLQALMEL	I	II	II	I	II	III	II	II	I	II	I
8	ALSSSQAEV	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
9	SLITGQDLLSV	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
10	QLIEKNWLL	I	II	I	I	I	I	I	I	II	I	I
11	LLDPKTIFL	I	I	I	I	II	I	I	I	I	I	I
13	RLHDENILL	I	I	II	I	I	I	I	I	II	I	I
14	YTFSGDVQL	I	I	I	I	I	II	I	IV	I	III	I
17	GLLPSAESIKL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
18	KTASINQNV	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
21	YLMDDFSSL	I	I	II	I	I	I	I	I	II	I	I
22	LMYPYIYHV	I	I	II	I	I	I	I	I	I	I	I
24	KVWSDVTPPL	I	I	IV	I	IV	II	II	IV	II	IV	IV
39	YLEDGFAYV	I	II	II	I	II	II	III	I	III	I	I
40	KIWEELSVLEV	I	I	II	I	III	IV	I	III	IV	III	II
41	IVTEIIEI	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
43	LLIPFTIFM	I	II	II	I	II	II	I	IV	I	II	I
46	ISLDEVAVSL	I	I	I	I	I	I	I	I	III	I	I
47	GLNGFNVLL	I	II	I	I	I	I	I	I	III	I	II
49	KLIGNIHGNEV	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
50	ILLSVLHQL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
67	FLIENLLAA	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
76	FTAEFLEKV	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
83	GLLENSPHL	I	II	II	I	I	II	II	I	III	I	III
84	FLLEREQLL	I	II	I	I	I	I	I	I	II	I	II
85	KLLDKPEQFL	I	I	I	I	I	IV	I	I	I	I	I
86	SLFSNIESV	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
88	LLLPLELSLA	I	I	I	I	I	I	I	I	III	I	I
89	SLAETIFIV	I	III	I	I	I	I	II	I	II	I	I
92	RLFEEVLGV	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
95	KLIDEDEPLFL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
96	ALDTTRHEL	I	II	I	I	I	I	I	I	I	I	I
102	GLYPVTLVGV	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I

116	ALLSSVAEA	I	I	II	I	I	I	I	IV	I	II	I
117	TLLEGISRA	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I	I
147	GLLSALENV	I	III	I	IV	I	I	I	I	I	I	I
148	YLILSSHQL	I	III	I	IV	I	I	I	I	I	I	I
152	ILVTSIFFL	I	II	I	II	I	I	I	I	I	I	I
153	KLVELEHTL	I	I	II	I	II	II	I	II	I	II	I
155	TLDSYLKAV	I	I	III	I	I	I	I	I	I	I	I
156	VILTSSPFL	I	I	I	II	I	I	I	I	I	I	I
157	ILQDQGFLV	I	I	I	II	I	III	I	I	II	I	I
158	YLDPLWHQL	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
166	LLGDSSFFL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
169	ALADLSVAV	I	I	I	I	I	I	I	II	I	III	I
170	FIAAVVEKV	I	I	I	I	I	II	II	I	I	I	I
181	LLWAPTAQA	I	I	I	I	II	I	I	I	II	I	I
185	TLYQGLPAEV	I	I	II	I	I	I	III	IV	I	I	IV
203	FLFVDPELV	II	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
220	ALSELERVL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
222	LLTGVFAQL	I	I	I	I	II	I	I	I	I	II	I
233	SLFESLEYL	I	I	II	I	II	II	II	II	I	I	I
234	VLLNEILEQV	I	I	I	I	I	I	I	I	III	I	I
235	SLLNQPKAV	I	I	I	I	I	I	II	I	II	I	I
236	KMSELQTYV	I	II	I	I	I	I	I	I	II	I	I
237	ALLEQTGDMSL	I	II	I	I	I	I	I	I	II	I	I
241	KQFEGTVEI	I	II	II	I	I	I	I	I	II	I	I
242	KLQEEIPVL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
243	GLAEFQENV	I	II	I	I	I	I	I	I	II	I	I
245	ALLEEEEGV	I	I	I	I	I	II	I	II	II	II	I
246	ALAGIVTNV	I	I	II	I	II	I	III	I	I	II	I
248	VLMQDSRLYL	I	II	I	I	I	I	I	I	I	I	I
251	LLWGNLPEI	I	II	I	I	I	I	I	I	I	I	I
252	SLMEKNQSL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I
253	KLLAVIHLE	I	II	II	I	I	II	II	I	III	I	III
255	FLMKNSDLYGA	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
257	KLIDHQGLYL	I	I	I	I	I	I	II	I	II	I	I
260	ALNESLVEC	I	III	I	I	II	I	II	IV	II	II	II
261	GLAALAVHL	I	II	I	I	I	I	I	I	III	I	I
263	SIIEYLPTL	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
264	TLHDQVHLL	I	I	IV	I	I	I	IV	I	I	I	IV
265	FLLDKPQDLSI	I	I	I	I	II	I	II	I	I	I	I
267	YLLDMPLWYL	I	II	I	I	I	I	I	I	III	I	I
269	GLLDCPIFL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
270	TLLTFFHEL	I	I	I	I	I	II	I	II	II	I	I
271	VLIEYNFSI	I	I	I	I	I	II	I	III	II	I	I
274	TLYNPERTITV	II	IV	II	III	IV	IV	IV	IV	IV	II	II
277	KLQEELNKV	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
279	VLMDEGAVLTL	I	I	I	II	I	I	I	I	I	I	I
283	ALSELLQGV	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
286	FLTEMVHFI	I	I	I	I	I	I	I	I	II	II	I

Пример 3. Иммуногенность *in vitro* для пептидов, презентуемых МНС I класса

Для получения информации об иммуногенности пептидов TUMAP по настоящему изобретению заявители провели исследования с использованием прайминга Т-клеток *in vitro* на основе повторных стимуляций CD8⁺ Т-клеток искусственными антигенпрезентирующими клетками (иАПК), нагруженными комплексами пептид-МНС и антителом к CD28. Таким образом заявители могли показать иммуногенность для пока что 47 рестриктированных по HLA-A*0201 пептидов TUMAP по изобретению, демонстрируя, что эти пептиды являются Т-клеточными эпитопами, против которых у человека имеются CD8⁺ Т-клетки-предшественники (табл. 6А и В).

Прайминг CD8⁺ Т-клеток *in vitro*

В целях проведения стимуляций *in vitro* искусственными антигенпрезентирующими клетками, нагруженными комплексом пептид-МНС (рМНС) и антителом к CD28, заявители сначала выделили CD8⁺ Т-клетки из свежего продукта лейкофереза HLA-A*02 методом позитивной селекции с помощью микросфер CD8 (Miltenyi Biotec, Бергиш-Гладбах, Германия). Кровь была получена от здоровых доноров (после подписания формы информированного согласия) из Университетской клиники г. Мангейм, Германия. МКПК и выделенные CD8⁺ лимфоциты инкубировали до использования в Т-клеточной среде (TCM), состоящей из RPMI-Glutamax (Invitrogen, Карлсруэ, Германия) с добавлением 10% инактивированной нагреванием человеческой сыворотки АВ (PAN-Biotech, Эйденбах, Германия), 100 Ед/мл пенициллина/100 мкг/мл стрептомицина (Cambrex, Кёльн, Германия), 1 мМ пирувата натрия (CC Pro, Обердорла, Германия) и 20 мкг/мл гентамицина (Cambrex). 2,5 нг/мл ИЛ-7 (PromoCell, Гейдельберг, Германия) и 10 Ед/мл ИЛ-2 (Novartis Pharma, Нюрнберг, Германия) также добавляли на этом этапе в среду

ТСМ. Получение микросфер, покрытых рМНС и антителами к CD28, стимуляции Т-клеток и считывание производили на хорошо исследованной системе *in vitro*, используя четыре различные молекулы рМНС для каждого цикла стимуляций и 8 различных молекул рМНС для каждого цикла считывания.

Очищенный костимуляторный IgG2a мыши к антителам человека CD28 Ab 9.3 (Jung et al., 1987) был химически биотинилирован с использованием сульфо-N-гидроксисукцинимидобiotина, как рекомендуется изготовителем (Perbio, Бонн, Германия). Использованные микросферы представляли собой полистирольные частицы размером 5,6 мкм, покрытые стрептавидином (Bangs Laboratories, Иллинойс, США).

рМНС, использованные для положительных и отрицательных контрольных стимуляций, были A*0201/MLA-001 (пептид ELAGIGILTV (SEQ ID NO. 289) из модифицированного Melan-A/MART-1) и A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVNI из DDX5, SEQ ID NO. 290) соответственно.

800 000 микросфер/200 мкл вносили в лунки 96-луночного планшета в присутствии 4×12,5 нг другого биотинилированного комплекса рМНС, промывали и затем добавляли 600 нг биотинилированных антител к CD28 в объеме 200 мкл. Стимуляцию проводили в 96-луночных планшетах путем совместной инкубации 1×10⁶ CD8+ Т-клеток с 2×10⁵ промытых покрытых микросфер в 200 мкл среды ТСМ с добавлением 5 нг/мл ИЛ-12 (PromoCell) в течение 3 дней при 37°C. Половина среды была затем заменена на свежую среду ТСМ с добавлением 80 Ед/мл ИЛ-2, и инкубация была продолжена в течение 4 дней при 37°C. Данный цикл стимуляций производили в общей сложности три раза. Для считывания с рМНС-мультимеров использовали 8 различных молекул рМНС на цикл. Использовался двумерный комбинаторный подход к кодировке, как было описано ранее (Andersen et al., 2012) с незначительными изменениями, относящимися к мечению с 5 различными флуорохромами. Наконец, проводили анализ мультимеров посредством окрашивания клеток набором для определения жизнеспособности клеток при воздействии ближнего ИК-излучения с красителем Live/dead (Invitrogen, Карлсруэ, Германия), клоном SK1 антител CD8-FITC (BD, Гейдельберг, Германия) и мультимерами рМНС с флуоресцентными метками. Для анализа использовали цитометр BD LSRII SORP, снабженный подходящими лазерами и фильтрами. Пептид-специфические клетки были подсчитаны как процентная доля от всех CD8+ клеток. Оценку результатов анализа мультимеров проводили с помощью программы FlowJo (Tree Star, Орегон, США). Прайминг *in vitro* специфических мультимер-положительных CD8+ лимфоцитов оценивали сравнением со стимуляциями отрицательного контроля. Иммуногенность для заданного антигена была определена, если было обнаружено, что по меньшей мере в одной подлежащей оценке простимулированной *in vitro* лунке одного здорового донора содержалась специфическая CD8+ Т-клеточная линия после стимуляции *in vitro* (т.е. когда данная лунка содержала по меньшей мере 1% специфичных мультимер-положительных среди CD8-положительных Т-клеток и процентная доля специфичных мультимер-положительных клеток была по меньшей мере в 10 раз выше медианного значения стимуляций отрицательного контроля).

Иммуногенность пептидов *in vitro*

Для проанализированных пептидов, связанных с молекулами HLA I класса, иммуногенность *in vitro* могла быть продемонстрирована генерированием пептид-специфических Т-клеточных линий. Типичные результаты проточного цитометрического анализа после TUMAP-специфического окрашивания мультимеров для 15 пептидов по изобретению показаны на фиг. 3 и 6 вместе с соответствующими отрицательными контролями. Результаты для 22 пептидов по изобретению обобщаются в табл. 6А и В.

Таблица 6А: Иммуногенность *in vitro* пептидов HLA I класса по изобретению

Отдельные результаты экспериментов по иммуногенности *in vitro*, проведенных заявителем для пептидов по изобретению. <20%=+; 21-49%=++; 50-69%=+++; >=70%=++++

Seq ID	Последовательность	лунки	доноры
288	SLYKGLLSV	++	++++
287	KIQEILTQV	+	+++

Таблица 6В: Иммуногенность пептидов по изобретению HLA I класса in vitro

Отдельные результаты экспериментов по иммуногенности in vitro, проведенных заявителем для рестриктивных по HLA-A*02 пептидов по изобретению. Указаны результаты экспериментов по иммуногенности in vitro. Процентные доли положительных лунок и доноров (среди подлежащих оценке) обобщены согласно следующему критерию: <20%=+; 20-49%=++; 50-69%=+++; >=70%=++++

SEQ ID	Последовательность	Положительные лунки [%]
4	VLFGELPAL	+
7	ALLQALMEL	++
9	SLITGQDLLSV	+
11	LLDPKTIFL	++
14	YTFSGDVQL	+
17	GLLPSAESIKL	+
18	KTASINQNV	+++
27	GLLGKVTSV	+
29	KMISAIPTL	+
34	TLNTLDINL	++++
35	VIKGLEEI	+
39	YLEDGFAYV	++++
48	KISDFGLATV	++
50	ILLSVLHQL	+
66	AMFPDTIPRV	+
77	ALYGNVQQV	+
82	ILAEPIYIRV	+++
89	SLAETIFIV	+
92	RLFEEVLGV	++
97	KLFEKSTGL	+
101	SLLEVNEASSV	+
102	GLYPVTLVGV	+
117	TLLEGISRA	++
121	ALYVQAPTV	+
157	ILQDGGFLV	+
166	LLGDSSFFL	++
183	ALSYILPYL	+++
203	FLFVDPELV	+++
233	SLFESLEYL	+
234	VLLNEILEQV	++
236	KMSELQTYV	+
242	KLQEEIPVL	+
246	ALAGIVTNV	+
248	VLMQDSRLYL	++
251	LLWGNLPEI	++
253	KLLAVIHEL	++
254	ALGDKFLLRV	+
255	FLMKNSDLYGA	+
257	KLIDHQGLYL	+
260	ALNESLVEC	+
261	GLAALAVHL	++
263	SIIEYLPTL	+
264	TLHDQVHLL	+
267	YLLDMPLWYL	+
275	AVPPPPSSV	++

Пример 4. Синтез пептидов

Все пептиды были синтезированы стандартным и общепринятым методом твердофазного синтеза пептидов с использованием Fmoc-методики.

Идентичность и чистоту каждого отдельного пептида определяли с помощью масс-спектрометрии и аналитической ОФ ВЭЖХ. Были получены пептиды в виде белого или грязно-белого лиофилизата (соль трифторацетата) со степенью чистоты >50%.

Все пептиды TUMAP предпочтительно вводят в виде солей трифторацетатов или ацетатов, возможны также другие солевые формы.

Пример 5. Анализ связывания МНС

Пептиды-кандидаты для Т-клеточной терапии в соответствии с настоящим изобретением далее были испытаны на их способность связываться с МНС (аффинность). Отдельные комплексы пептида и мо-

лекулы МНС были получены с помощью реакции обмена лигандами под воздействием УФ-излучения, при которой УФ-чувствительный пептид расщепляется под воздействием УФ-излучения, и получается продукт обмена с исследуемым пептидом. Только пептиды-кандидаты, которые могут эффективно связываться и стабилизировать восприимчивые к пептиду молекулы МНС, предотвращают диссоциацию комплексов с МНС. Для определения выхода продукта реакции обмена проводили анализ методом ELISA на основе обнаружения легкой цепи ($\beta 2m$) стабилизированных комплексов с МНС. Этот анализ производили, в основном, как описано у Rodenko и соавт. (Rodenko et al., 2006).

В 96-луночные планшеты MAXISorp (NUNC) на ночь вносили 2 мкг/мл стрептавидина в PBS при комнатной температуре, промывали 4 раза и блокировали в течение 1 ч при 37°C в 2% БСА, содержащем блокирующий буфер. Полученные в результате рефолдинга мономеры HLA-A*02:01/MLA-001 служили в качестве стандарта, покрывающего диапазон 15-500 нг/мл. Мономерные комплексы пептид-МНС после реакции обмена под воздействием УФ-излучения 100-кратно разводили в блокирующем буфере. Образцы инкубировали в течение 1 ч при 37°C, промывали четыре раза, инкубировали в течение 1 ч при 37°C с 2 мкг/мл пероксидазы хрена, конъюгированной с антителом к $\beta 2m$, снова промывали и проводили обнаружение с помощью раствора ТМБ; реакцию останавливали NH_4SO_4 . Величину поглощения измеряли при длине волны 450 нм. Пептиды-кандидаты, которые демонстрировали высокий выход реакции обмена (предпочтительно более 50%, наиболее предпочтительно, более 75%) обычно являются предпочтительными для генерирования и получения антител или их фрагментов и(или) Т-клеточных рецепторов или их фрагментов, поскольку они проявляют достаточную авидность по отношению к молекулам МНС и предотвращают диссоциацию комплексов МНС.

Таблица 7. Показатели связывания с молекулами МНС I класса

SEQ ID	Последовательность	Пептидный обмен
1	KLQEKIQL	++++
3	RVIDDSL VGV	+++
4	VLFGELPAL	+++
5	GLVDIMVHL	+++
6	FLNAIETAL	++++
7	ALLQALMEL	+++
9	SLITGQDLLSV	+++
10	QLIEKNWLL	+++
11	LLDPKTIFL	+++
12	RLLDPKTIFL	+++
13	RLHDENILL	+++
14	YTFSGDVQL	+++
16	SLADLSLLL	+++
17	GLLPSAESIKL	++++
18	KTASINQNV	++
19	KVFELDLVTL	++
20	ALVEKGEFAL	++
21	YLMDDFSSL	+++
22	LMYPYIYHV	+++
23	ALLSPLSLA	+++
24	KVWSDVTPL	+++
25	LLWGHPRVALA	+++
26	VLDGKVAVV	+++

27	GLLGKVTSV	+++
28	IKVTDLPQLEL	++
29	KMISAIPTL	++
30	IITEVITRL	+++
31	GLLETTGLLAT	+++
33	TLDRNSLYV	++
34	TLNTLDINL	+++
35	VIIKGLEEI	++
36	TVLQELINV	+++
37	QIVELIEKI	++
38	VLQQESNFL	++
39	YLEDGFAYV	+++
40	KIWEELSVLEV	+++
41	IVTEIISEI	+++
42	KQMSISTGL	++
44	AVFNLVHVV	+++
45	FLPVSVVYV	+++
47	GLNGFNVLL	+++
48	KISDFGLATV	+++
49	KLIGNIHGNEV	++
50	ILLSVLHQL	+++
51	LDSEALLTL	++
52	TIGIPFPNV	++
53	AQHLSTLLL	+
54	YLVPGLVAA	+++
55	HLFDKIIKI	+++
57	TLYPGRFDYV	++
58	HLLGEGAFQV	+++
59	ALADGIKSFLL	+++
60	YLFSQGLQGL	+++
61	ALYPKEITL	+++
62	SLVENIHVL	+++
63	KLLPMVIQL	+++
64	SLYAGSNNQV	++
65	SLSEKSPEV	++
66	AMFPDTIPRV	++
67	FLIENLLAA	+++
68	QLMNLIRSV	+++
69	LKVLKADVVL	++
70	GLTEKTVLV	++
71	HMSGKLTNV	++
72	VLSTRVTNV	++
74	GLAFLPASV	++

75	ALLDGALQL	+++
76	FTAEFLEKV	+++
77	ALYGNVQQV	+++
79	TVLEEIGNRV	++
80	VLTGQVHEL	+++
81	ILAEPIYI	++
82	ILAEPIYIRV	+++
83	GLLENSPHL	++
84	FLLEREQLL	++++
85	KLLDKPEQFL	++
86	SLFSNIESV	+++
87	KLLSLLEEA	+++
88	LLLPLELSLA	+++
89	SLAETIFIV	+++
90	AILNVDEKNQV	++
91	LLPSIFLMV	++
92	RLFEEVLGV	++++
93	RLYGYFHDA	++
94	YLDEVAFML	+++
95	KLIDEDEPLFL	+++
96	ALDTTRHEL	++
97	KLFEKSTGL	+++
98	FVQEKIPEL	+++
99	TLFGIQLTEA	+++
100	ALQSFEFRV	+++
101	SLLEVNEASSV	+++
102	GLYPVTLVGV	+++
103	YLADTVQKL	++
105	AMLASQTEA	++
106	VLLGSVVIFA	++
107	RVLPGQAVTGV	++
108	FIANLPPELKA	+++
109	ILGSFELQL	+++
110	QIQGQVSEV	++
111	AQLEGKLVSI	+++
112	ILAQDVAQL	+++
113	FLFLKEVKV	++
114	LLFPSDVQTL	++
115	ILHGEVNVK	++
116	ALLSSVAEA	++
117	TLLEGISRA	++
119	SLIEESEEL	++
121	ALYVQAPTV	++

122	SIIDTELKV	+++
123	QTAPEEAFIKL	+
124	ALLRLFTI	++
125	AALEVLAEV	+++
126	QLREAFEQL	+++
128	SILTNISEV	++
129	KMASKVTQV	++
130	QLYGSAITL	+++
131	SLYPHFTLL	+++
132	ALLNNVIEV	+++
133	FLDGRPLTL	++
134	SLYKSFLQL	++
136	LLWDAPAKC	+++
137	KLIYKDLVSV	++
138	GIINKLVTV	++
139	IILENIQSL	+++
140	FLDSQITTV	+++
141	NIDINNNEL	++
142	LLDAAHASI	++
143	MLWESIMRV	+++
144	FLISQTPLL	+++
145	ALEEKLENV	+++
146	VVA AHLAGA	++
147	GLLSALENV	+++
148	YLILSSHQL	+++
149	NMADGQLHQV	++
150	VLLDMVHSL	+++
151	DISKRIQSL	++
153	KLVELEHTL	+++
154	AIKEIQTV	++
155	TLDSYLKAV	++
157	ILQDGGFLV	++
158	YLDPLWHQL	+++
159	QLGPVPVTI	+++
160	TLQEWLTEV	+++
161	NLLDENVCL	++++
162	GLLGNNLTSL	+++
163	GLEERLYTA	++
164	MLIIRVPSV	+++
165	SLLDYEVS	+++
166	LLGDSSFFL	+++
167	LVVDEGSLVSV	+++
168	VIFEGEPMYL	+++

169	ALADLSVAV	+++
170	FIAAVVEKV	++
171	LLLLDVPTA	++
173	RLIDIYKNV	+++
174	ALYSGDLHAA	++
175	SLLDLVQSL	+++
176	VQSGLRILL	++
177	ALINVLNAL	+++
178	SLVSWQLLL	++++
179	TLGEIIKGV	+++
180	RLYEEEIRI	+++
181	LLWAPTAQA	+++
182	GLQDGFQITV	+++
183	ALSYILPYL	+++
184	ALDSTIAHL	++
185	TLYQGLPAEV	++
187	SILKEDPFL	++
188	VLGEEQEGV	++
190	SLSTELFKV	+++
191	AAIEIFEKV	+++
192	TLLPSSGLVTL	++
193	ALFHMNILL	+++
194	KLLEEVQLL	++
195	VIIQNLPAL	+++
198	ILTNKVVS	++
199	SVADLAHVL	++
200	IMPTFDLTKV	+++
203	FLFVDPELV	++
204	SEWGSPHAAVP	+++
206	GLDAFRIFL	++++
207	KLFETVEEL	+++
208	HLNNDNRNPL	++
210	GLAGDNIYL	+++
211	LLTTVLINA	+++
212	MTLSEIHAV	++
213	ILAVDGVLSV	+++
214	ALFETLIQL	+++
215	QIADIVTSV	++
216	ALSTVTPRI	++
217	LLWPSSVPA	+++
218	SLTGANITV	+++
219	GVVPTIQKV	++
220	ALSELERVL	+++

221	IMLNSVEEI	++
222	LLTGVFAQL	++
223	ALHPVQFYL	+++
224	LLFDWSGTGRADA	+++
225	FLPQPVPPLSV	+++
226	SLAGNLQEL	+++
227	SEMEELPSV	+
228	SLLELDGINLRL	+++
229	YLYELEHAL	++
230	KLLNMIFSI	+++
231	LLDDIFIRL	+++
233	SLFESLEYL	+++
234	VLLNEILEQV	++++
235	SLLNQPKAV	++
236	KMSELQTYV	+++
237	ALLEQTGDMSL	+++
238	HLQEKLQSL	++
239	VIIKGLLEEITV	+++
241	KQFEGTVEI	+++
242	KLQEEIPVL	+++
243	GLAEFQENV	++
244	NVAEIVIH	+++
245	ALLEEEEGV	++
246	ALAGIVTNV	+++
247	NLLIDDKGTIKL	++
248	VLMQDSRLYL	+++
249	YLYQILQGI	+++
250	LMQDSRLYL	+++
251	LLWGNLPEI	+++
252	SLMEKNQSL	++
253	KLLAVIH	+++
254	ALGDKFLLRV	++
255	FLMKNSDLYGA	+++
256	FLNDIFERI	+++
257	KLIDHQGLYL	+++
258	QLVQRVASV	++
259	GPGIFPPPPQP	+
260	ALNESLVEC	+++
261	GLAALAVHL	+++
262	LLLEAVVHL	+++
263	SIIEYLPTL	+++
264	TLHDQVHLL	++
265	FLLDKPQDLSI	+++
266	FLLDKPQDL	++
267	YLLDMPLWYL	+++
268	SLDKDIVAL	++
269	GLLDCPIFL	++++
270	TLLTFFHEL	+++
271	VLIEYNFSI	+++
272	FVMEGEPPKL	++
273	SLNKQIETV	++
274	TLYNPRTITV	+++
275	AVPPPPSSV	++
276	RMPTVLQCV	+++
277	KLQEELNKV	+++
278	VLEDKVLVS	+++
279	VLMDEGAVLTL	++
280	HLWGHALFL	+++
281	LLLESDPKVYSL	++
282	SLYALHVKA	++
283	ALSELLQQV	+++
284	KLMDPGSLPPL	++
285	MLLDTVQKV	+++
286	FLTEMVHFI	+++

Связывание рестриктированных по молекулам HLA I класса пептидов с HLA-A*02:01 оценивали по выходу пептидного обмена: >10%=+; >20%=++; >50%=+++; >75%=++++

Пример 6.

Таблица 8. Предпочтительные пептиды в соответствии с настоящим изобретением

SEQ ID No	Последовательность	Код пептида
11	LLDPKTIFL	HAVCR1-001
14	YTFSGDVQL	MMP1-003
21	YLMDDFSSL	COL6A3-015
24	KVWSDVTPL	MMP-002
25	LLWGHPRVALA	MXRA5-003
40	KIWEELSVLEV	MAGEA3-003
85	KLLDKPEQFL	FMN1-001
89	SLAETIFIV	HTR3A-001
117	TLLEGISRA	CABY-001
153	KLVELEHTL	CT83-001
155	TLDSYLKAV	CYP4Z-001
157	ILQDGQFLV	DCAF4L2-001
168	VIFEGEPMYL	HORMAD1-001
233	SLFESLEYL	ZFP42-001
245	ALLEEEGV	MAGEA4-003
253	KLLAVIHEL	RAD54B-002
264	TLHDQVHLL	ESR1-001
274	TLNPERTITV	IGF-004

Абсолютное количественное определение опухолеассоциированных пептидов, презентруемых на поверхности клетки

Получение связывающих компонентов, таких как антитела и/или ТКР, является лабораторным процессом, который может проводиться лишь для ряда выбранных мишеней. В случае опухолеассоциированных и -специфических пептидов, критерии отбора включали, но не были ограничены, исключительностью презентации и плотностью пептида, презентруемого на поверхности клеток. В дополнение к выделению и относительному количественному определению пептидов, описанных в настоящем документе, заявители анализировали абсолютное число копий пептида на клетку в соответствии с описанием. Количественное определение копий TUMAP на клетку в образцах солидных опухолей требует абсолютного количественного определения выделенного пептида TUMAP, эффективности выделения TUMAP и числа клеток проанализированного образца ткани.

Количественное определение пептида с помощью наноЖХ-МС/МС

Для точного количественного определения пептидов методом масс-спектрометрии проводили построение калибровочной кривой для каждого пептида при использовании метода внутреннего стандарта. Внутренний стандарт является вариантом каждого пептида с двойными изотопными метками, т.е. во время синтеза TUMAP были введены две аминокислоты с изотопными метками. От опухолеассоциированного пептида он отличается лишь по своей массе, но не имеет различий по другим физико-химическим свойствам (Anderson et al., 2012). Внутренний стандарт добавляли в известном количестве в каждый МС-образец, и все МС-сигналы были нормализованы относительно МС-сигнала внутреннего стандарта, чтобы сгладить потенциальные технические вариации МС-экспериментов.

Калибровочные кривые были построены по меньшей мере в трех разных матрицах, т.е. элюатах пептида HLA из природных образцов, подобных обычным образцам для МС, и каждый препарат прошел два цикла измерений на МС. В целях оценки проводили нормализацию МС-сигналов относительно сигнала внутреннего стандарта и расчет калибровочной кривой методом логистической регрессии.

Для количественного определения опухолеассоциированных пептидов из образцов тканей в соответствующие образцы также добавляли известное количество внутреннего стандарта; проводили нормализацию МС-сигналов относительно внутреннего стандарта и проводили количественное определение с помощью калибровочной кривой пептида.

Эффективность выделения комплексов пептид/МНС

Как в случае любого процесса очистки белков, выделение белков из образцов ткани связано с определенными потерями исследуемого белка. Для определения эффективности выделения пептида TUMAP для всех пептидов TUMAP, выбранных для абсолютного количественного определения, были получены комплексы пептид-МНС. Чтобы отличить комплексы пептид-МНС со стандартными добавками от комплексов с природным пептидом, использовали версии пептидов TUMAP с одной изотопной меткой, т.е. во время синтеза TUMAP вводили одну аминокислоту с изотопной меткой. Данные комплексы добавляли в качестве стандартной добавки в свежеприготовленные лизаты тканей, т.е. в самый ранний возможный момент процесса выделения пептида TUMAP, а затем проводили улавливание, как природных комплексов пептид-МНС в процессе последующей аффинной очистки. Таким образом, измерение степени извлечения однократно меченых пептидов TUMAP позволяет сделать заключения относительно эффек-

тивности выделения отдельных природных пептидов TUMAP.

Эффективность выделения анализировали на небольшом числе образцов, и она была сопоставимой среди этих образцов тканей. Напротив, эффективность выделения отдельных пептидов различна. Поэтому можно предположить, что эффективность выделения, хотя она определялась только для ограниченного числа образцов тканей, может быть экстраполирована на любой другой препарат ткани. Тем не менее, необходимо проанализировать каждый пептид TUMAP в отдельности, поскольку эффективность выделения не может быть экстраполирована с одного пептида на другие.

Определение числа клеток в твердой замороженной ткани

В целях определения числа клеток образцов тканей, подлежащих абсолютному количественному определению пептида, авторы изобретения применяли анализ содержания ДНК. Этот метод применим к широкому диапазону образцов различного происхождения и, что наиболее важно, к замороженным образцам (Alcoser et al., 2011; Forsey and Chaudhuri, 2009; Silva et al., 2013). Во время выполнения протокола выделения образец ткани обрабатывают до получения гомогенного лизата, из которого берут небольшую аликвоту лизата. Аликвоту делят на три части, из которых выделяют ДНК (набор QiaAmp DNA Mini Kit, Qiagen, Хильден, Германия). Общее содержание ДНК из каждой процедуры выделения ДНК подвергается количественному определению с помощью количественного анализа ДНК на основе флуоресценции (набор для количественного анализа Qubit dsDNA HS, Life Technologies, Дармштадт, Германия) по меньшей мере на двух повторных циклах.

В целях расчета числа клеток по аликвотам отдельных здоровых клеток крови строят стандартную кривую для ДНК с диапазоном заданных количеств клеток. Стандартная кривая используется для расчета общего содержания клеток из общего содержания ДНК для каждой процедуры выделения ДНК. Среднее общее число клеток образца ткани, используемого для выделения пептида, экстраполируют с учетом известного объема аликвот лизата и общего объема лизата.

Число копий пептида на одну клетку

С помощью данных перечисленных ранее экспериментов авторы изобретения рассчитали число копий пептидов TUMAP на клетку, разделив общее количество пептида на общее число клеток в образце, а затем поделив на эффективность выделения. Число копий клеток для выбранных пептидов показано в табл. 9.

Таблица 9. Абсолютное число копий.

SEQ ID No.	Код пептида	Число копий на клетку (медиана)	Количество образцов
11	HAVCR1-001	+	22
14	MMP1-003	++	10
21	COL6A3-015	+	35
24	MMP-002	+	33
85	FMN1-001	+	18
89	HTR3A-001	+++	17
117	CABY-001	+	17
155	CYP4Z-001	++	18
157	DCAF4L2-001	++	16
245	MAGEA4-003	+	33
253	RAD54B-002	+++	6
264	ESR1-001	+	16
274	IGF-004	+	6

В таблице указаны результаты абсолютного количественного определения пептидов в опухолевых образцах. Медианное число копий на клетку указано для каждого пептида: <100=+; >=100=++; >=1,000+++; >=10,000=++++. Указано число образцов, для которых имеются поддающиеся оценке, высококачественные данные МС

Список цитируемой литературы

Adelaide, J. et al., Cancer Res **67** (2007): 11565-11575

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

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

American Cancer Society, (2015), www.cancer.org

- Ampie, L. et al., *Front Oncol.* **5** (2015): 12
- Andersen, R. S. et al., *Nat.Protoc.* **7** (2012): 891-902
- Anderson, N. L. et al., *J Proteome.Res* **11** (2012): 1868-1878
- Appay, V. et al., *Eur.J Immunol.* **36** (2006): 1805-1814
- Arafat, H. et al., *Surgery* **150** (2011): 306-315
- Aung, P. P. et al., *Oncogene* **25** (2006): 2546-2557
- Avigan, D. et al., *Clin Cancer Res.* **10** (2004): 4699-4708
- Baba, T. et al., *Eur.J Cardiothorac.Surg.* **43** (2013): 759-764
- Bahnassy, A. A. et al., *World J Gastroenterol.* **20** (2014): 18240-18248
- Banchereau, J. et al., *Cell* **106** (2001): 271-274
- Band, A. M. et al., *J Mammary.Gland.Biol Neoplasia.* **16** (2011): 109-115
- Bankovic, J. et al., *Lung Cancer* **67** (2010): 151-159
- Beatty, G. et al., *J Immunol* **166** (2001): 2276-2282
- Beaty, T. H. et al., *Hum.Genet.* **132** (2013): 771-781
- Beggs, J. D., *Nature* **275** (1978): 104-109
- Bell, J. L. et al., *J Clin Oncol* **33** (2015): 1285-1293
- Bell, J. L. et al., *Cell Mol Life Sci.* **70** (2013): 2657-2675
- Benjamini, Y. et al., *Journal of the Royal Statistical Society.Series B (Methodological)*, **57** (1995): 289-300
- Berger, C. et al., *Curr.Mol.Med.* **13** (2013): 1229-1240
- Berman, R. S. et al., *National Cancer Institute: PDQ(R) Colon Cancer Treatment* (2015a)
- Berman, R. S. et al., *National Cancer Institute: PDQ(R) Rectal Cancer Treatment* (2015b)
- Bhan, S. et al., *Oncol Rep.* **28** (2012): 1498-1502
- Bode, P. K. et al., *Mod.Pathol.* **27** (2014): 899-905

- Bogush, T. A. et al., *Antibiot.Khimioter.* **54** (2009): 41-49
- Bonventre, J. V., *Trans.Am.Clin Climatol.Assoc.* **125** (2014): 293-299
- Boulter, J. M. et al., *Protein Eng* **16** (2003): 707-711
- Braumuller, H. et al., *Nature* (2013)
- Bray, F. et al., *Int J Cancer* **132** (2013): 1133-1145
- Brossart, P. et al., *Blood* **90** (1997): 1594-1599
- Bruckdorfer, T. et al., *Curr.Pharm.Biotechnol.* **5** (2004): 29-43
- Butterfield, L. H. et al., *Clin Cancer Res* **12** (2006): 2817-2825
- Butterfield, L. H. et al., *Clin Cancer Res* **9** (2003): 5902-5908
- Caballero, O. L. et al., *PLoS.One.* **5** (2010)
- Carballido, E. et al., *Cancer Control* **19** (2012): 54-67
- Card, K. F. et al., *Cancer Immunol Immunother.* **53** (2004): 345-357
- Chang, Y. S. et al., *Cancer Chemother.Pharmacol.* **59** (2007): 561-574
- Chanock, S. J. et al., *Hum.Immunol.* **65** (2004): 1211-1223
- Chapiro, J. et al., *Radiol.Med.* **119** (2014): 476-482
- Chen, H. S. et al., *Zhonghua Gan Zang.Bing.Za Zhi.* **11** (2003): 145-148
- Chen, S. T. et al., *Cancer Sci.* **102** (2011b): 2191-2198
- Chen, Y. L. et al., *Int J Surg.* **11** (2013c): 85-91
- Chen, Y. T. et al., *Cancer Immun.* **5** (2005): 9
- Cierna, Z. et al., *BMC.Cancer* **14** (2014): 472
- Ciruelos Gil, E. M., *Cancer Treat.Rev* **40** (2014): 862-871
- Cohen, C. J. et al., *J Mol Recognit.* **16** (2003a): 324-332
- Cohen, C. J. et al., *J Immunol* **170** (2003b): 4349-4361
- Cohen, S. N. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **69** (1972): 2110-2114
- Coligan, J. E. et al., *Current Protocols in Protein Science* (1995)

- Colombetti, S. et al., J Immunol. **176** (2006): 2730-2738
- Coosemans, A. et al., Anticancer Res **33** (2013): 5495-5500
- Coulie, P. G. et al., Immunol.Rev **188** (2002): 33-42
- Counter, C. M. et al., Blood **85** (1995): 2315-2320
- Cuadros, T. et al., Cancer Res **74** (2014): 1416-1428
- Cuadros, T. et al., Eur.J Cancer **49** (2013): 2034-2047
- Dalerba, P. et al., Int.J Cancer **93** (2001): 85-90
- De, Plaen E. et al., Immunogenetics **40** (1994): 360-369
- Dengjel, J. et al., Clin Cancer Res **12** (2006): 4163-4170
- Denkberg, G. et al., J Immunol **171** (2003): 2197-2207
- Downie, D. et al., Clin Cancer Res. **11** (2005): 7369-7375
- Du, X. et al., Clin Cancer Res **20** (2014): 6324-6335
- Duan, Z. et al., Clin Cancer Res **9** (2003): 2778-2785
- Ek, S. et al., Cancer Res **62** (2002): 4398-4405
- Emens, L. A., Expert.Rev.Anticancer Ther. **12** (2012): 1597-1611
- Enguita-German, M. et al., World J Hepatol. **6** (2014): 716-737
- Estey, E. H., Am.J Hematol. **89** (2014): 1063-1081
- Falk, K. et al., Nature **351** (1991): 290-296
- Ferlay et al., GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No.11 [Internet], (2013), <http://globocan.iarc.fr>
- Findeis-Hosey, J. J. et al., Biotech.Histochem. **87** (2012): 24-29
- Fong, L. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **98** (2001): 8809-8814
- Forsey, R. W. et al., Biotechnol.Lett. **31** (2009): 819-823
- Frasor, J. et al., Mol.Cell Endocrinol. **418 Pt 3** (2015): 235-239
- Fuge, O. et al., Res Rep.Urol. **7** (2015): 65-79
- Fujiyama, T. et al., J Dermatol.Sci. **75** (2014): 43-48

- Fukuyama, T. et al., *Cancer Res.* **66** (2006): 4922-4928
- Fuqua, S. A. et al., *Breast Cancer Res Treat.* **144** (2014): 11-19
- Gabrilovich, D. I. et al., *Nat Med.* **2** (1996): 1096-1103
- Gandhi, A. V. et al., *Ann Surg.Oncol* **20 Suppl 3** (2013): S636-S643
- Gardina, P. J. et al., *BMC.Genomics* **7** (2006): 325
- Gattinoni, L. et al., *Nat Rev.Immunol* **6** (2006): 383-393
- Giannopoulos, K. et al., *Leukemia* **24** (2010): 798-805
- Giannopoulos, K. et al., *Int.J Oncol* **29** (2006): 95-103
- Gibbs, P. et al., *Melanoma Res* **10** (2000): 259-264
- Gnjatic, S. et al., *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100** (2003): 8862-8867
- Godkin, A. et al., *Int.Immunol* **9** (1997): 905-911
- Gong, Y. et al., *Adv.Anat.Pathol.* **21** (2014): 191-200
- Grah, J. J. et al., *Tumori* **100** (2014): 60-68
- Granziero, L. et al., *Blood* **97** (2001): 2777-2783
- Green, M. R. et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* **4th** (2012)
- Greenfield, E. A., *Antibodies: A Laboratory Manual* **2nd** (2014)
- Gu, X. et al., *Sci.Rep.* **4** (2014): 6625
- Gunawardana, C. et al., *Br.J Haematol.* **142** (2008): 606-609
- Hall, R. D. et al., *Cancer Control* **20** (2013): 22-31
- Hamilton, K. E. et al., *Mol.Cancer Res* **13** (2015): 1478-1486
- Han, L. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* **7** (2014): 6734-6742
- Hanagiri, T. et al., *Anticancer Res.* **33** (2013): 2123-2128
- Harig, S. et al., *Blood* **98** (2001): 2999-3005
- Hasegawa, H. et al., *Arch.Pathol.Lab Med.* **122** (1998): 551-554
- Hayashi, S. I. et al., *Endocr.Relat Cancer* **10** (2003): 193-202

- Hennard, C. et al., J Pathol. **209** (2006): 430-435
- Herbert, N. et al., J Immunol. **185** (2010): 902-916
- Hinrichs, C. S. et al., Nat.Biotechnol. **31** (2013): 999-1008
- Hiramoto, T. et al., Oncogene **18** (1999): 3422-3426
- Hoffmann, N. E. et al., Cancer **112** (2008): 1471-1479
- Holtl, L. et al., Clin.Cancer Res. **8** (2002): 3369-3376
- Hsu, H. C. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. **329** (2005): 1108-1117
- Hu, S. et al., J Cancer Res Clin Oncol **140** (2014): 883-893
- Huang, X. et al., Cell Prolif. **48** (2015b): 593-599
- Hui, L. et al., Oncol Rep. **34** (2015): 2627-2635
- Hussein, Y. M. et al., Med.Oncol **29** (2012): 3055-3062
- Hwang, M. L. et al., J Immunol. **179** (2007): 5829-5838
- Ioannidis, P. et al., Anticancer Res **23** (2003): 2179-2183
- Jeng, Y. M. et al., Br.J Surg. **96** (2009): 66-73
- Jung, G. et al., Proc Natl Acad Sci U S A **84** (1987): 4611-4615
- Kalos, M. et al., Sci.Transl.Med. **3** (2011): 95ra73
- Kang, C. Y. et al., J Gastrointest. Surg. **18** (2014): 7-15
- Kibbe, A. H., Handbook of Pharmaceutical Excipients **rd** (2000)
- Kim, Y. D. et al., Int.J Mol.Med. **29** (2012): 656-662
- Kobayashi, H. et al., Oncol Lett. **10** (2015): 612-618
- Koido, S. et al., World J Gastroenterol. **19** (2013): 8531-8542
- Krackhardt, A. M. et al., Blood **100** (2002): 2123-2131
- Krieg, A. M., Nat Rev.Drug Discov. **5** (2006): 471-484
- Lederer, M. et al., Semin.Cancer Biol **29** (2014): 3-12
- Lee, M. Y. et al., J Cell Physiol **224** (2010): 17-27

- Lee, W. C. et al., J Immunother. **28** (2005): 496-504
- Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, **030/099**, (2014)
- Leivo, I. et al., Cancer Genet.Cytogenet. **156** (2005): 104-113
- Leonetti, M. D. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **109** (2012): 19274-19279
- Li, H. et al., Bull.Cancer **99** (2012): E26-E33
- Li, M. et al., Clin Cancer Res **11** (2005): 1809-1814
- Li, W. M. et al., J Surg.Oncol (2016)
- Li, Y. et al., Cancer Epidemiol. **39** (2015): 8-13
- Liddy, N. et al., Nat Med. **18** (2012): 980-987
- Lin, J. et al., Clin Cancer Res **10** (2004): 5708-5716
- Lin, L. et al., Oncol Lett. **6** (2013): 740-744
- Lisitskaia, K. V. et al., Mol.Gen.Mikrobiol.Virusol. (2010): 34-37
- Liu, X. et al., Int.Immunopharmacol. **25** (2015): 416-424
- Ljunggren, H. G. et al., J Exp.Med. **162** (1985): 1745-1759
- Llovet, J. M. et al., N.Engl.J Med. **359** (2008): 378-390
- Longenecker, B. M. et al., Ann N.Y.Acad.Sci. **690** (1993): 276-291
- Lonsdale, J., Nat.Genet. **45** (2013): 580-585
- Lukas, T. J. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **78** (1981): 2791-2795
- Lundblad, R. L., Chemical Reagents for Protein Modification **3rd** (2004)
- Luo, C. et al., Clin Cancer Res **13** (2007): 1288-1297
- Mantia-Smaldone, G. M. et al., Hum.Vaccin.Immunother. **8** (2012): 1179-1191
- Marten, A. et al., Cancer Immunol.Immunother. **51** (2002): 637-644
- Mason, J. M. et al., Nucleic Acids Res. **43** (2015): 3180-3196
- Massari, F. et al., Cancer Treat.Rev. **41** (2015): 114-121
- Matsueda, S. et al., World J Gastroenterol. **20** (2014): 1657-1666

- Maus, M. V. et al., Blood **123** (2014): 2625-2635
- Mayr, C. et al., Exp.Hematol. **34** (2006): 44-53
- Mayr, C. et al., Blood **105** (2005): 1566-1573
- Mehta, A. et al., Breast **23** (2014): 2-9
- Meziere, C. et al., J Immunol **159** (1997): 3230-3237
- Miyagi, Y. et al., Clin Cancer Res **7** (2001): 3950-3962
- Miyoshi, Y. et al., Med.Mol.Morphol. **43** (2010): 193-196
- Molina, J. R. et al., Mayo Clin Proc. **83** (2008): 584-594
- Mongan, N. P. et al., Mol.Carcinog **45** (2006): 887-900
- Morgan, R. A. et al., Science **314** (2006): 126-129
- Mori, M. et al., Transplantation **64** (1997): 1017-1027
- Mortara, L. et al., Clin Cancer Res. **12** (2006): 3435-3443
- Moulton, H. M. et al., Clin Cancer Res **8** (2002): 2044-2051
- Mueller, L. N. et al., J Proteome.Res **7** (2008): 51-61
- Mueller, L. N. et al., Proteomics. **7** (2007): 3470-3480
- Mumberg, D. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **96** (1999): 8633-8638
- Murray, G. I. et al., Histopathology **57** (2010): 202-211
- National Cancer Institute, (5-6-2015), www.cancer.gov
- Noubissi, F. K. et al., J Invest Dermatol. **134** (2014): 1718-1724
- Oehrich, N. et al., Int.J Cancer **117** (2005): 256-264
- Okuno, K. et al., Exp.Ther Med. **2** (2011): 73-79
- Ottaviani, S. et al., Cancer Immunol.Immunother. **55** (2006): 867-872
- Otte, M. et al., Cancer Res **61** (2001): 6682-6687
- Ozeki, N. et al., Int.J Mol.Sci. **17** (2016)
- Pai, V. P. et al., Breast Cancer Res **11** (2009): R81

- Palmer, D. H. et al., *Hepatology* **49** (2009): 124-132
- Palomba, M. L., *Curr.Oncol Rep.* **14** (2012): 433-440
- Perez, C. A. et al., *Expert.Rev Anticancer Ther.* **11** (2011): 1599-1605
- Phan, G. Q. et al., *Cancer Control* **20** (2013): 289-297
- Pineda, C. T. et al., *Cell* **160** (2015): 715-728
- Pinheiro, J. et al., *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models* (<http://CRAN.R-project.org/package=nlme>) (2015)
- Plebanski, M. et al., *Eur.J Immunol* **25** (1995): 1783-1787
- Porta, C. et al., *Virology* **202** (1994): 949-955
- Porter, D. L. et al., *N.Engl.J Med.* **365** (2011): 725-733
- Prasad, M. L. et al., *Head Neck* **26** (2004): 1053-1057
- Qian, Z. et al., *Mol.Cancer Res* **12** (2014): 335-347
- Quinn, D. I. et al., *Urol.Oncol.* (2015)
- Raman, J. D. et al., *Carcinogenesis* **27** (2006): 499-507
- Rammensee, H. G. et al., *Immunogenetics* **50** (1999): 213-219
- Reck, M., *Ann.Oncol* **23 Suppl 8** (2012): viii28-viii34
- RefSeq, The NCBI handbook [Internet], Chapter 18, (2002), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21091/>
- Reinisch, C. M. et al., *Int.J Exp.Pathol.* **92** (2011): 326-332
- Reinisch, W. et al., *J Immunother.* **25** (2002): 489-499
- Reinmuth, N. et al., *Dtsch.Med.Wochenschr.* **140** (2015): 329-333
- Ries, J. et al., *Int.J Oncol* **26** (2005): 817-824
- Rinaldi, A. et al., *Pathobiology* **77** (2010): 129-135
- Rini, B. I. et al., *Curr.Opin.Oncol.* **20** (2008): 300-306
- Rini, B. I. et al., *Cancer* **107** (2006): 67-74
- Risinger, J. I. et al., *Clin Cancer Res* **13** (2007): 1713-1719

- Rock, K. L. et al., Science **249** (1990): 918-921
- Rodenko, B. et al., Nat Protoc. **1** (2006): 1120-1132
- S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, **032-010OL**, (2013)
- S3-Leitlinie Lungenkarzinom, **020/007**, (2011)
- S3-Leitlinie maligne Ovarialtumore, **032-035OL**, (2013)
- S3-Leitlinie Mammakarzinom, **032-045OL**, (2012)
- S3-Leitlinie Melanom, **032-024OL**, (2013)
- S3-Leitlinie Prostatakarzinom, **043/022OL**, (2014)
- Saiki, R. K. et al., Science **239** (1988): 487-491
- Salman, B. et al., Oncoimmunology. **2** (2013): e26662
- Sangro, B. et al., J Clin Oncol **22** (2004): 1389-1397
- Schmidt, S. M. et al., Cancer Res **64** (2004): 1164-1170
- Seeger, F. H. et al., Immunogenetics **49** (1999): 571-576
- Shahzad, M. M. et al., Cancer Lett. **330** (2013): 123-129
- Sherman, F. et al., Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics (1986)
- Sherman-Baust, C. A. et al., Cancer Cell **3** (2003): 377-386
- Shi, M. et al., World J Gastroenterol. **10** (2004): 1146-1151
- Showel, M. M. et al., F1000Prime.Rep. **6** (2014): 96
- Siegel, S. et al., Blood **102** (2003): 4416-4423
- Silva, L. P. et al., Anal.Chem. **85** (2013): 9536-9542
- Singh-Jasuja, H. et al., Cancer Immunol.Immunother. **53** (2004): 187-195
- Skandalis, S. S. et al., Matrix Biol **35** (2014): 182-193
- Small, E. J. et al., J Clin Oncol. **24** (2006): 3089-3094
- Smith, M. J. et al., Br.J Cancer **100** (2009): 1452-1464
- Son, M. Y. et al., Stem Cells **31** (2013): 2374-2387

- Springelkamp, H. et al., Genet.Epidemiol. **39** (2015): 207-216
- Stahl, M. et al., Ann.Oncol. **24 Suppl 6** (2013): vi51-vi56
- Sturm, M. et al., BMC.Bioinformatics. **9** (2008): 163
- Su, Z. et al., Cancer Res. **63** (2003): 2127-2133
- Sun, H. et al., J BUON. **20** (2015): 296-308
- Szajnik, M. et al., Gynecol.Obstet.(Sunnyvale.) **Suppl 4** (2013): 3
- Szarvas, T. et al., Int J Cancer **135** (2014): 1596-1604
- Takayama, T. et al., Cancer **68** (1991): 2391-2396
- Takayama, T. et al., Lancet **356** (2000): 802-807
- Tanaka, F. et al., Int.J Oncol **10** (1997): 1113-1117
- Teufel, R. et al., Cell Mol Life Sci. **62** (2005): 1755-1762
- Thakkar, J. P. et al., Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev. **23** (2014): 1985-1996
- Thorsen, K. et al., Mol Cell Proteomics. **7** (2008): 1214-1224
- Tian, X. et al., J Transl.Med. **13** (2015): 337
- Toomey, P. G. et al., Cancer Control **20** (2013): 32-42
- Tradonsky, A. et al., Am.J Clin Pathol. **137** (2012): 918-930
- Tran, E. et al., Science **344** (2014): 641-645
- Urgard, E. et al., Cancer Inform. **10** (2011): 175-183
- van der Bruggen, P. et al., Immunol.Rev **188** (2002): 51-64
- van, Duin M. et al., Haematologica **96** (2011): 1662-1669
- Velinov, N. et al., Khirurgiia (Sofiia) (2010): 44-49
- Walter, S. et al., J Immunol **171** (2003): 4974-4978
- Walter, S. et al., Nat Med. **18** (2012): 1254-1261
- Wang, G. H. et al., Oncol Lett. **5** (2013): 544-548
- Wang, Y. et al., Anticancer Res **33** (2013): 207-214

- Wilhelm, S. M. et al., *Cancer Res* **64** (2004): 7099-7109
- Willcox, B. E. et al., *Protein Sci.* **8** (1999): 2418-2423
- Wittig, B. et al., *Hum. Gene Ther.* **12** (2001): 267-278
- Wlodarski, M. W. et al., *J Leukoc. Biol* **83** (2008): 589-601
- World Cancer Report, (2014)
- Wu, Z. Y. et al., *Scand. J Immunol.* **74** (2011): 561-567
- Xie, X. et al., *Oncol Lett.* **7** (2014): 1537-1543
- Xiong, D. et al., *Carcinogenesis* **33** (2012): 1797-1805
- Xu, J. et al., *J Mol. Biol* **377** (2008): 28-46
- Xu, L. et al., *Zhongguo Fei. Ai. Za Zhi.* **14** (2011): 727-732
- Xu, X. et al., *Exp. Mol. Pathol.* **97** (2014): 579-584
- Xu, Y. et al., *Sci. Rep.* **5** (2015): 12104
- Yakimchuk, K. et al., *Mol. Cell Endocrinol.* **375** (2013): 121-129
- Yamada, R. et al., *Tissue Antigens* **81** (2013): 428-434
- Yang, S. et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1772** (2007): 1033-1040
- Yao, J. et al., *Cancer Immunol. Res.* **2** (2014): 371-379
- Yin, B. et al., *Int. J Clin Exp. Pathol.* **7** (2014a): 2934-2941
- Yu, J. et al., *Gut* **64** (2015): 636-645
- Yu, W. et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **264** (2012): 73-83
- Yuan, R. H. et al., *Ann Surg. Oncol* **16** (2009): 1711-1719
- Zamuner, F. T. et al., *Mol. Cancer Ther.* **14** (2015): 828-834
- Zaremba, S. et al., *Cancer Res.* **57** (1997): 4570-4577
- Zhan, W. et al., *Clin Res Hepatol. Gastroenterol.* (2015)
- Zhang, H. et al., *Carcinogenesis* **35** (2014): 1863-1871
- Zhang, J. et al., *Oncotarget.* **6** (2015): 42040-42052
- Zhang, S. et al., *Int. J Clin Exp. Pathol.* **8** (2015): 541-550
- Zhang, X. et al., *Int. J Oncol* (2016)
- Zhao, H. et al., *Zhonghua Gan Zang. Bing. Za Zhi.* **10** (2002): 100-102
- Zou, T. T. et al., *Oncogene* **21** (2002): 4855-4862
- Follenzi A, et al. *Nat Genet.* 2000 Jun;25(2):217-22.
- Zufferey R, et al. *J Virol.* 1999 Apr;73(4):2886-92.
- Scholten KB, et al. *Clin Immunol.* 2006 May;119(2):135-45.
- Gustafsson C, et al. *Trends Biotechnol.* 2004 Jul;22(7):346-53. Review.
- Kuball, J., et al. (2007). *Blood* 109, 2331–2338.
- Schmitt, T. M., et al. (2009). *Hum. Gene Ther.* 20, 1240–1248

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептид, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 157 или идентичную ей по меньшей мере на 88%, связывающийся с молекулой(ами) главного комплекса гистосовместимости (МНС) и индуцирующий активацию Т-клеток; или

его фармацевтически приемлемая соль, где указанный пептид имеет общую длину от 9 до 30 аминокислот или состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 157.

2. Пептид по п.1, модифицированный и/или включающий непептидные связи с сохранением, по существу, эквивалентной активности.

3. Т-клеточный рецептор (ТКР), реагирующий с HLA-лигандом, идентичным по меньшей мере на 88% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 157 или состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 157.

4. ТКР по п.3, где указанный ТКР несет иммуностимулирующий домен или токсин.

5. Антитело, которое специфически распознает пептид по любому из пп.1, 2, связанный с молекулой МНС.

6. Нуклеиновая кислота, кодирующая пептид по любому из пп.1, 2.

7. Рекombинантная клетка-хозяин, включающая вектор экспрессии, способный экспрессировать нуклеиновую кислоту по п.6.

8. Способ получения пептида по любому из пп.1, 2, в комплексе с МНС, включающий культивацию клетки-хозяина по п.7, которая презентует пептид по любому из пп.1, 2, и выделение комплекса пептида и МНС из клетки-хозяина или его культуральной среды.

9. Способ получения активированных Т-лимфоцитов *in vitro*, включающий контактирование Т-лимфоцитов *in vitro* с нагруженными антигеном молекулами МНС человека I класса, экспрессированными на поверхности подходящей антигенпрезентирующей клетки или искусственной антигенпрезентирующей клетки, в течение периода времени, достаточного для активации указанных Т-лимфоцитов антиген-специфическим образом, где указанный антиген является пептидом по любому из пп.1 или 2.

10. Активированный Т-лимфоцит, полученный способом по п.9, который селективно распознает клетку, презентующую полипептид по любому из пп.1 или 2.

11. Фармацевтическая композиция для лечения рака, включающая по меньшей мере один активный ингредиент, выбранный из пептида по любому из пп.1, 2, Т-клеточного рецептора по п.3 или 4, антитела по п.5, нуклеиновой кислоты по п.6, клетки по п.7 или активированного Т-лимфоцита по п.10, и фармацевтически приемлемый носитель.

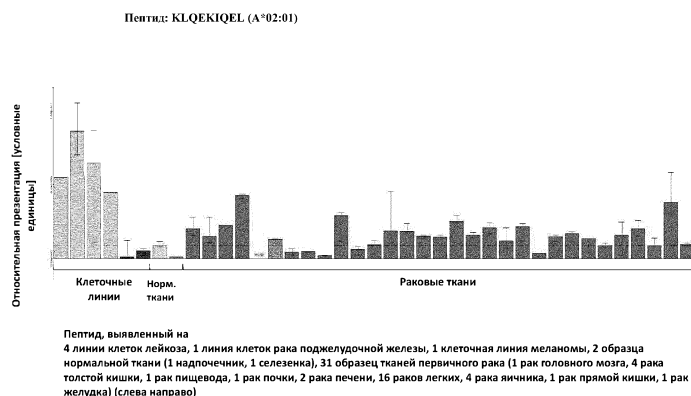
12. Применение пептида по любому из пп.1, 2 в производстве лекарственного средства против рака.

13. Применение по п.12, где указанный рак выбран из колоректальной карциномы (КРК), рака желудка (РЖ), рака пищевода, немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), рака поджелудочной железы (РПЖ), рака яичника (РЯ), меланомы, рака молочной железы, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), мелкоклеточного рака легких (МРЛ), неходжкинской лимфомы (НХЛ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), рака желчного пузыря и холангиокарциномы (РЖП, ХК), рака мочевого пузыря (РМП), рака матки (РЭМ) и других опухолей, которые демонстрируют избыточную экспрессию белка, включающего SEQ ID NO: 157.

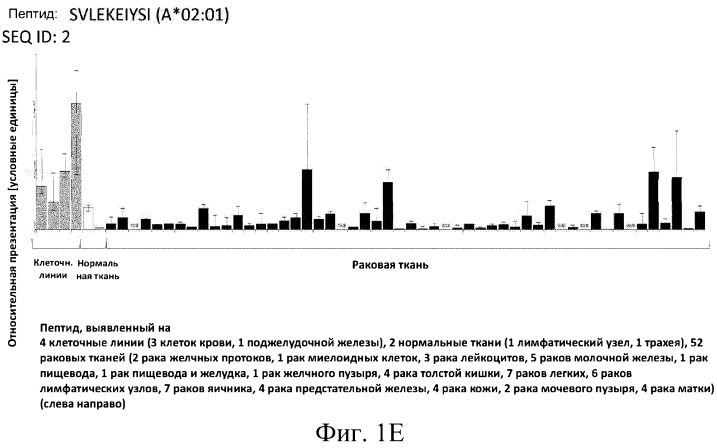
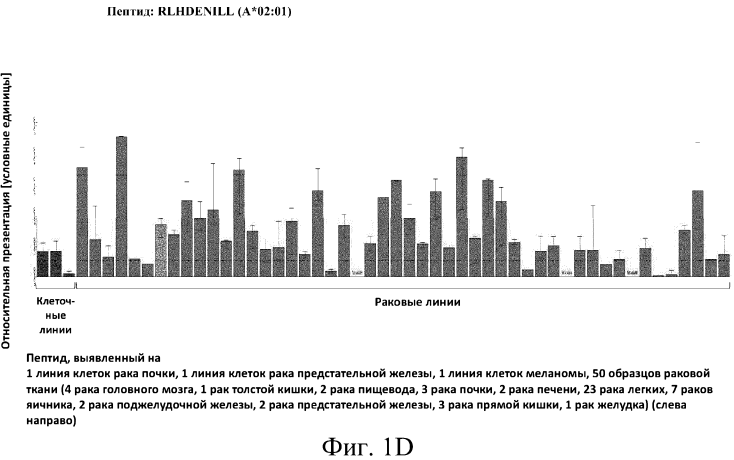
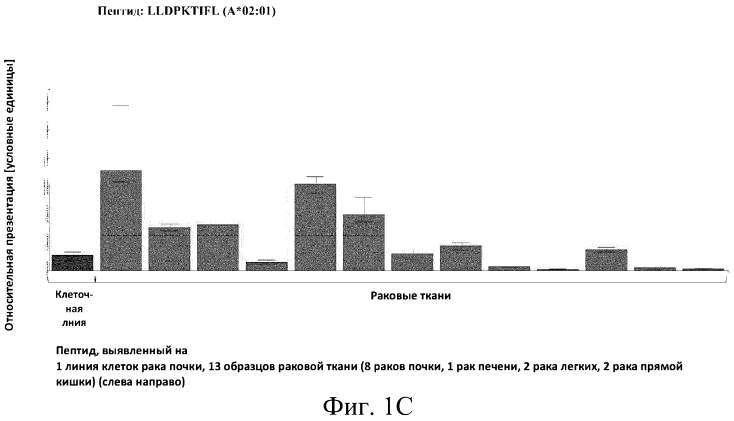
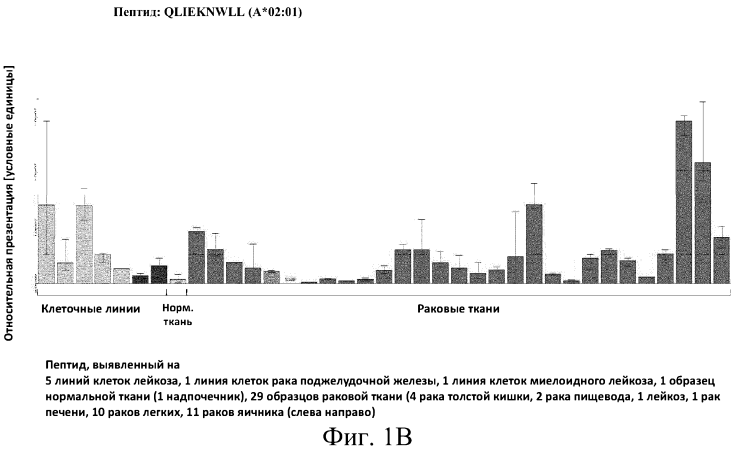
14. Набор для лечения рака, включающий:

а) контейнер, включающий фармацевтическую композицию, содержащую пептид по любому из пп.1, 2, Т-клеточный рецептор по п.3 или 4, антитело по п.5, нуклеиновую кислоту по п.6, клетку по п.7 или активированный Т-лимфоцит по п.10, в виде раствора или в лиофилизированной форме; и

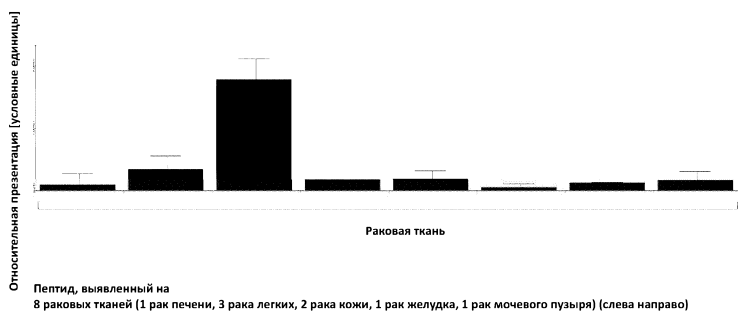
б) второй контейнер, содержащий разбавитель или восстанавливающий раствор для лиофилизированного состава.



Фиг. 1А

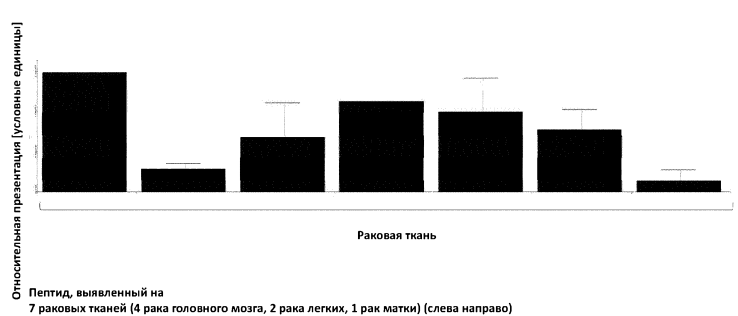


Пептид: KIWEELSVLEV (A*02:01)
SEQ ID: 40



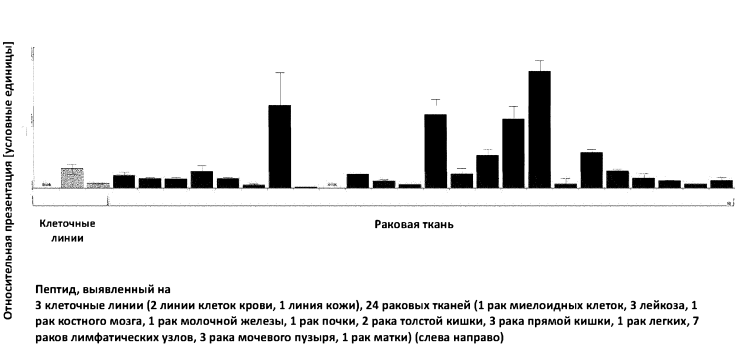
Фиг. 1F

Пептид: FLIENLLAA (A*02:01)
SEQ ID: 67



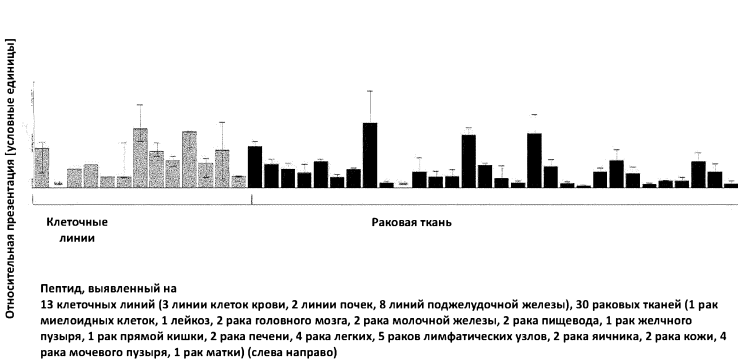
Фиг. 1G

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



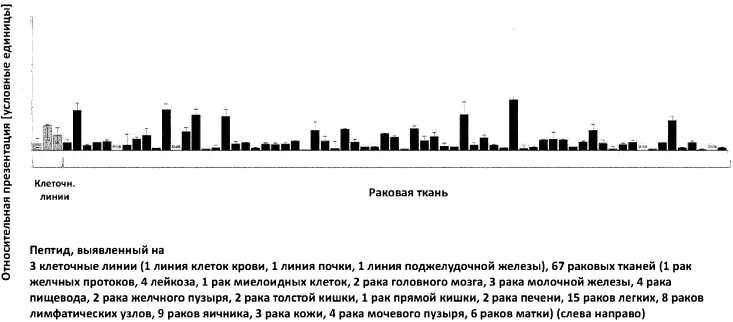
Фиг. 1H

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



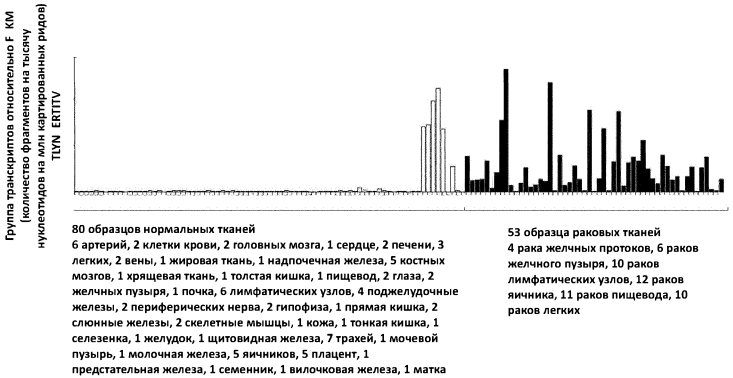
Фиг. 1I

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



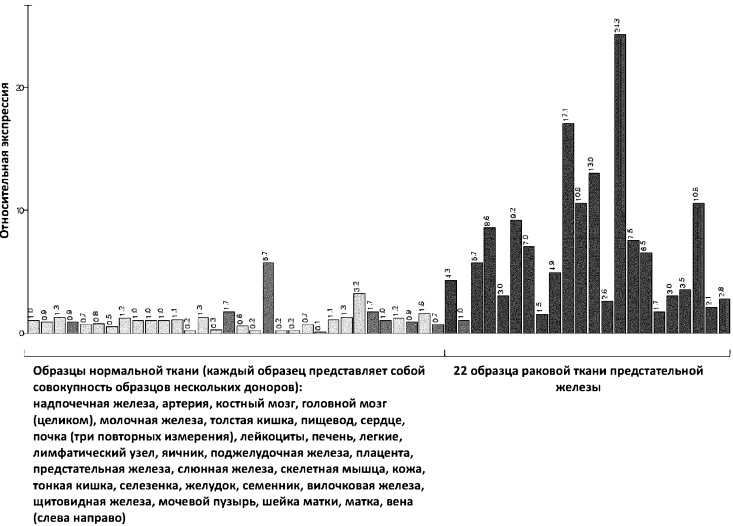
Фиг. 1J

Ген(ы): IGF2BP1, IGF2BP3
Пептид: TLYNPERTITV
SEQ ID: 274

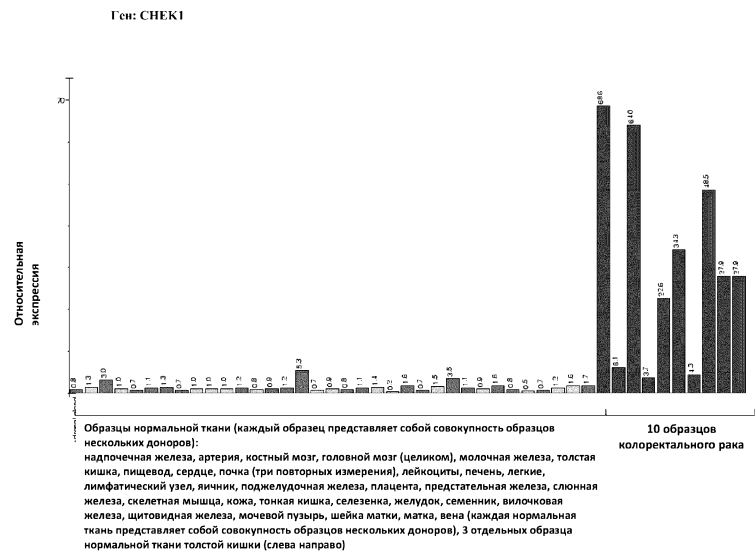


Фиг. 2H

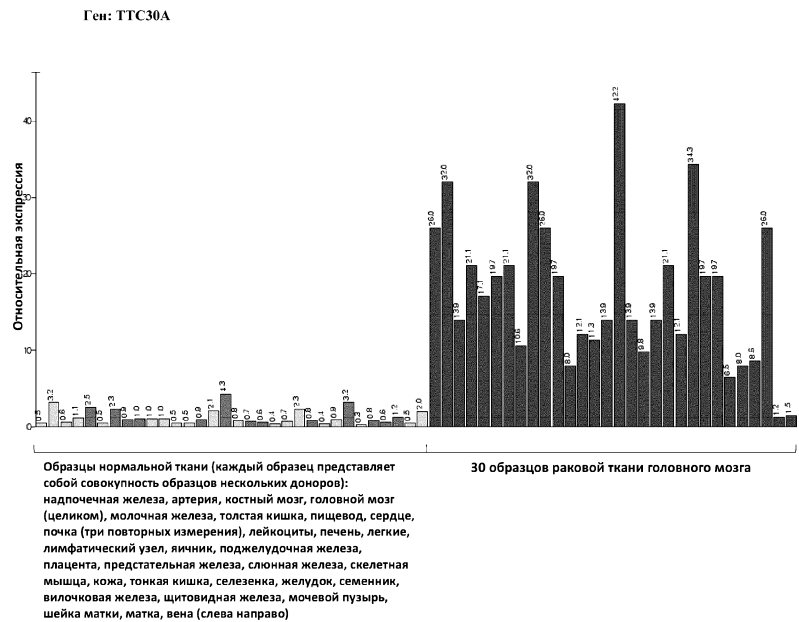
Ген: PRIM2



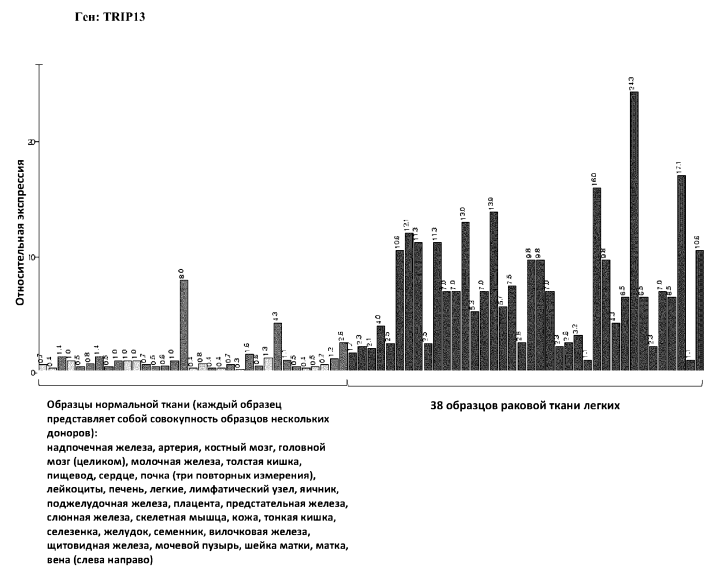
Фиг. 2A



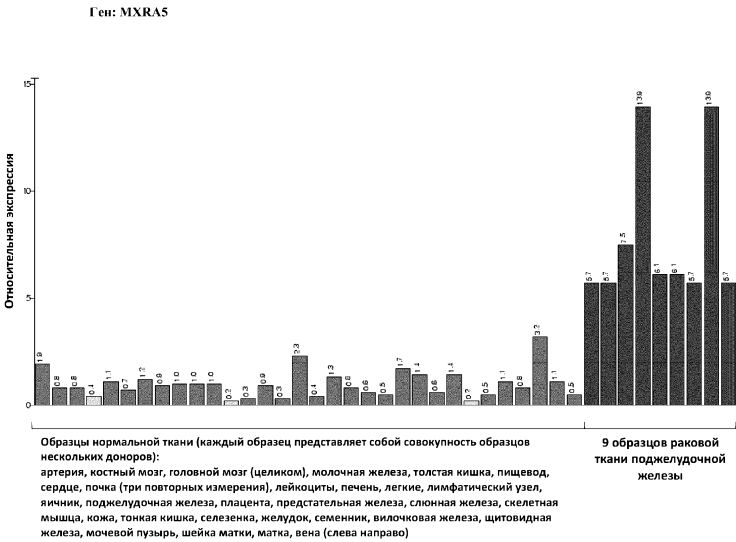
Фиг. 2В



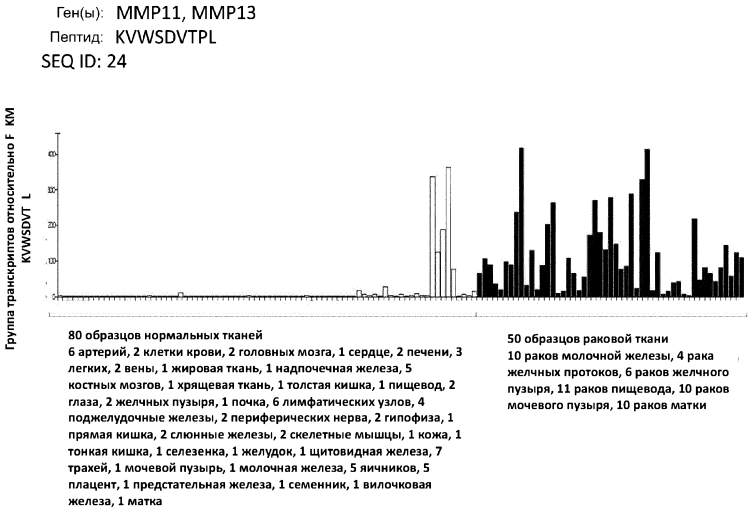
Фиг. 2С



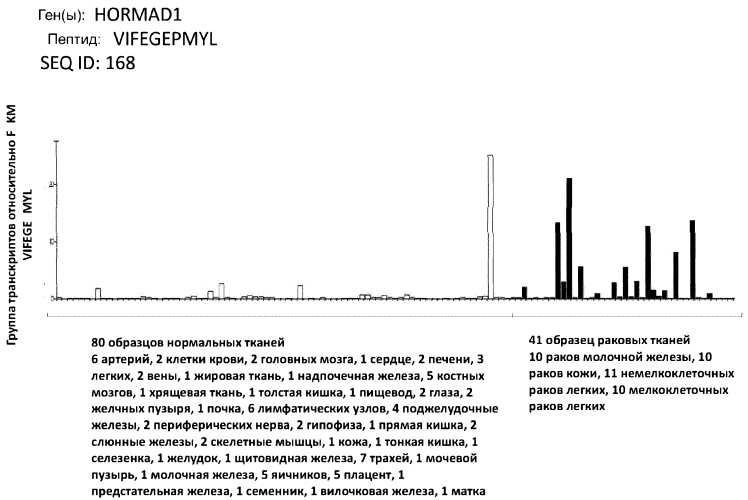
Фиг. 2D



Фиг. 2Е

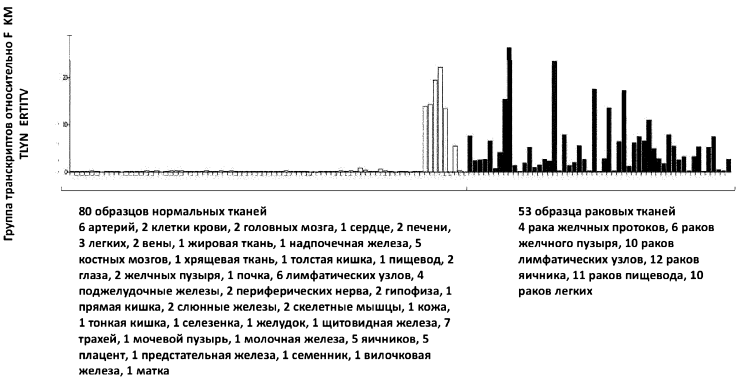


Фиг. 2F

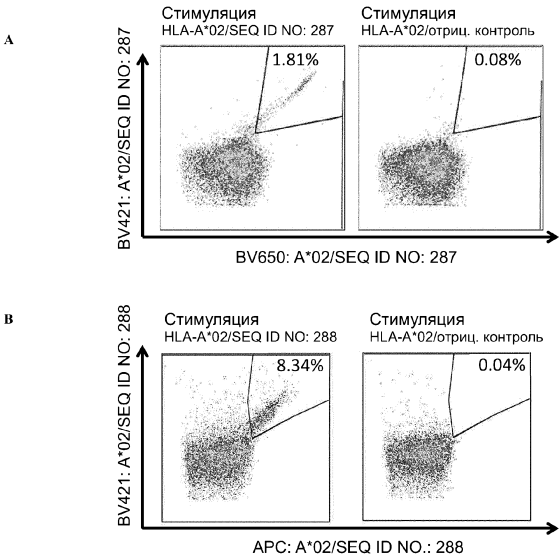


Фиг. 2G

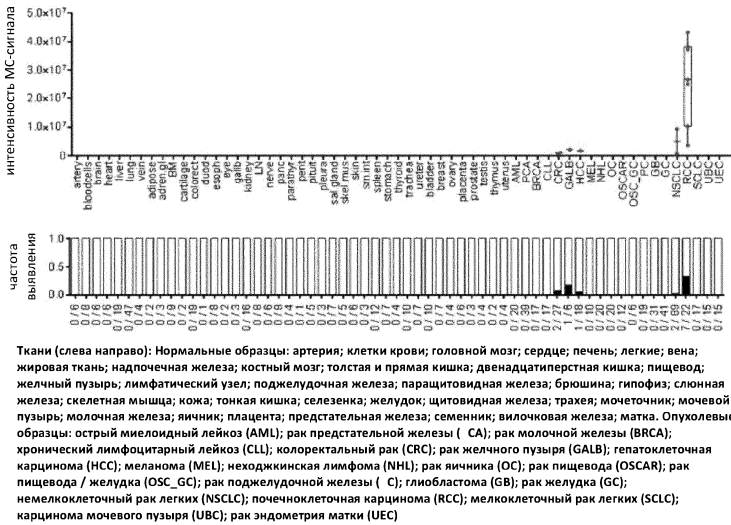
Ген(ы): IGF2BP1, IGF2BP3
Пептид: TLYNPERTITV
SEQ ID: 274



Фиг. 2Н

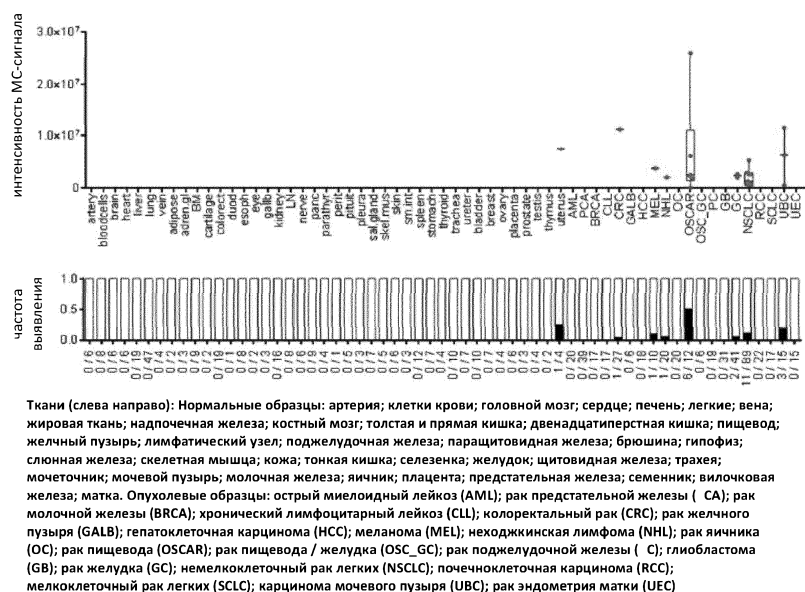


SEQ ID NO: 11: HAVCR1-001



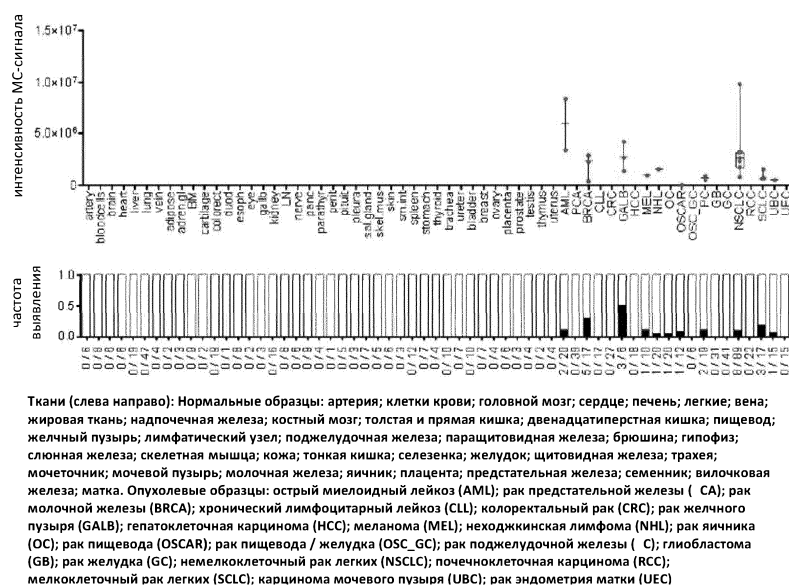
Фиг. 4А

SEQ ID NO: 14: MMP1-003



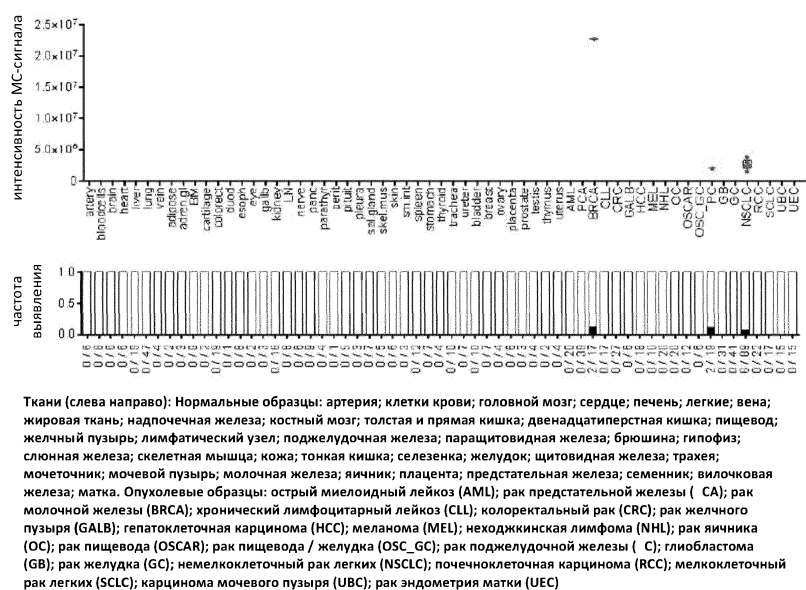
Фиг. 4В

SEQ ID NO: 21: COL6A3-015



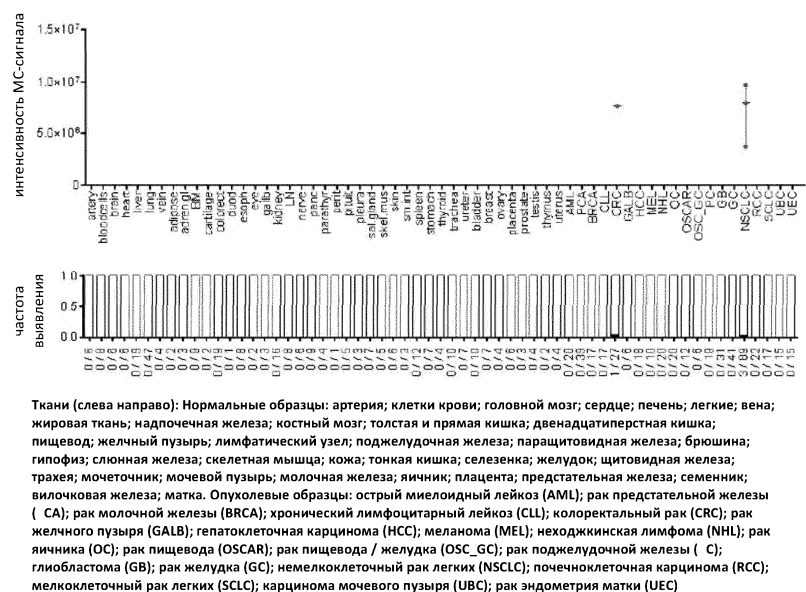
Фиг. 4С

SEQ ID NO: 24: MMP-002



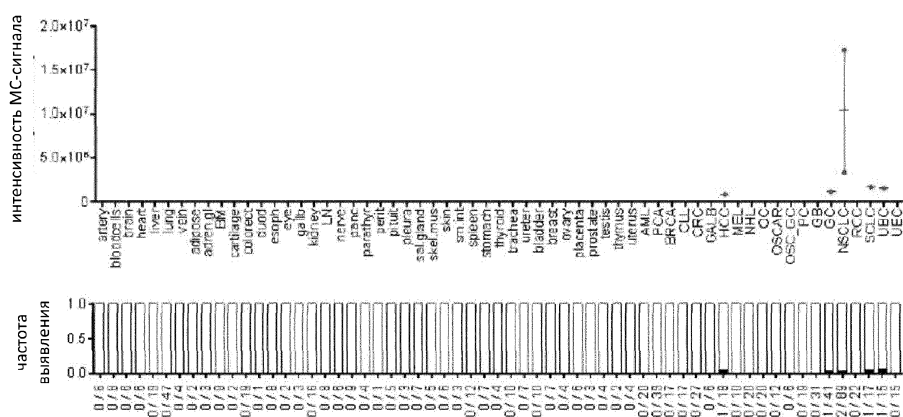
Фиг. 4D

SEQ ID NO: 25: MXRA5-003



Фиг. 4E

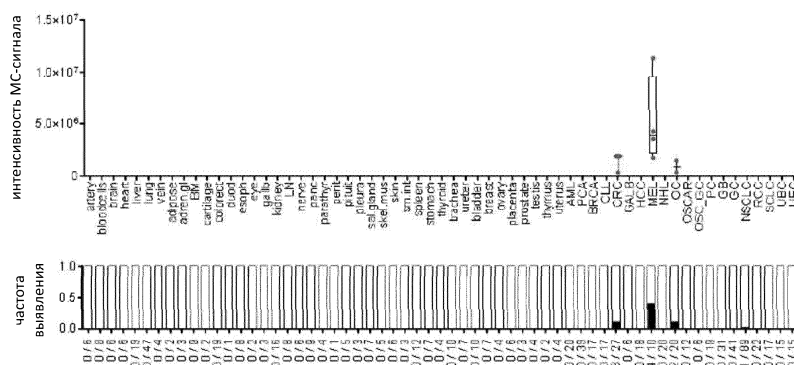
SEQ ID NO: 40: MAGEA3-003



Ткани (слева направо): Нормальные образцы: артерия; клетки крови; головной мозг; сердце; печень; легкие; вена; жировая ткань; надпочечная железа; костный мозг; толстая и прямая кишка; двенадцатиперстная кишка; пищевод; желчный пузырь; лимфатический узел; поджелудочная железа; паращитовидная железа; брюшина; гипофиз; слюнная железа; скелетная мышца; кожа; тонкая кишка; селезенка; желудок; щитовидная железа; трахея; мочеточник; мочевой пузырь; молочная железа; яичник; плацента; предстательная железа; семенник; вилочковая железа; матка. Опухолевые образцы: острый миелоидный лейкоз (AML); рак предстательной железы (CA); рак молочной железы (BRCA); хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL); колоректальный рак (CRC); рак желчного пузыря (GALB); гепатоклеточная карцинома (HCC); меланома (MEL); неходжкинская лимфома (NHL); рак яичника (OC); рак пищевода (OSCAR); рак пищевода / желудка (OSC_GC); рак поджелудочной железы (C); глиобластома (GB); рак желудка (GC); мелкоклеточный рак легких (NSCLC); почечноклеточная карцинома (RCC); мелкоклеточный рак легких (SCLC); карцинома мочевого пузыря (UBC); рак эндометрия матки (UEC)

Фиг. 4F

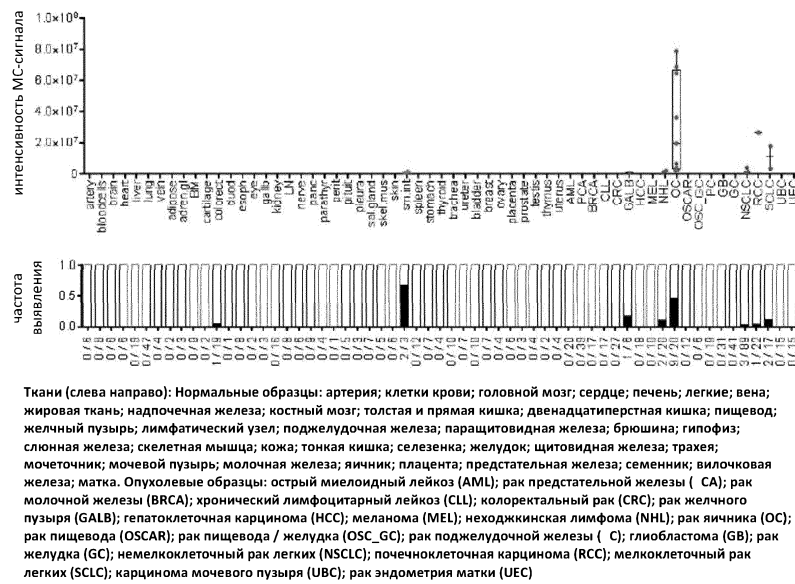
SEQ ID NO: 85: FMN1-001



Ткани (слева направо): Нормальные образцы: артерия; клетки крови; головной мозг; сердце; печень; легкие; вена; жировая ткань; надпочечная железа; костный мозг; толстая и прямая кишка; двенадцатиперстная кишка; пищевод; желчный пузырь; лимфатический узел; поджелудочная железа; паращитовидная железа; брюшина; гипофиз; слюнная железа; скелетная мышца; кожа; тонкая кишка; селезенка; желудок; щитовидная железа; трахея; мочеточник; мочевой пузырь; молочная железа; яичник; плацента; предстательная железа; семенник; вилочковая железа; матка. Опухолевые образцы: острый миелоидный лейкоз (AML); рак предстательной железы (CA); рак молочной железы (BRCA); хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL); колоректальный рак (CRC); рак желчного пузыря (GALB); гепатоклеточная карцинома (HCC); меланома (MEL); неходжкинская лимфома (NHL); рак яичника (OC); рак пищевода (OSCAR); рак пищевода / желудка (OSC_GC); рак поджелудочной железы (C); глиобластома (GB); рак желудка (GC); мелкоклеточный рак легких (NSCLC); почечноклеточная карцинома (RCC); мелкоклеточный рак легких (SCLC); карцинома мочевого пузыря (UBC); рак эндометрия матки (UEC)

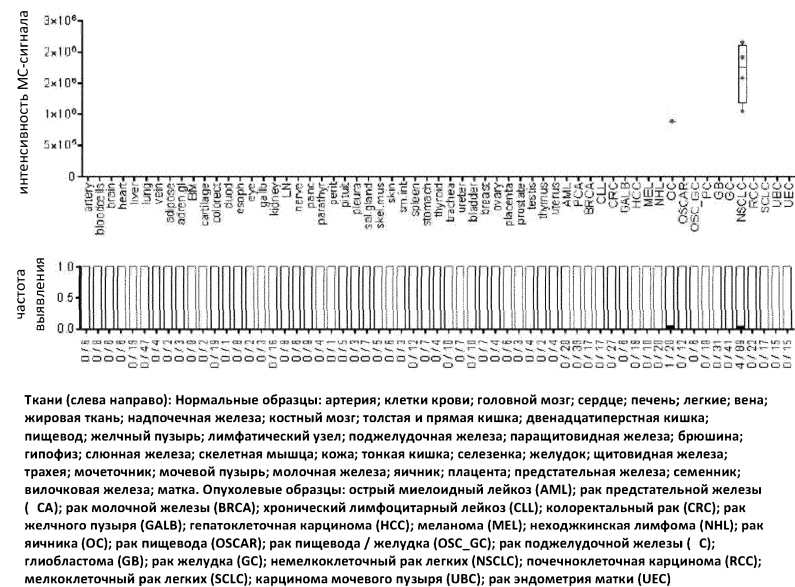
Фиг. 4G

SEQ ID NO: 89: HTR3A-001



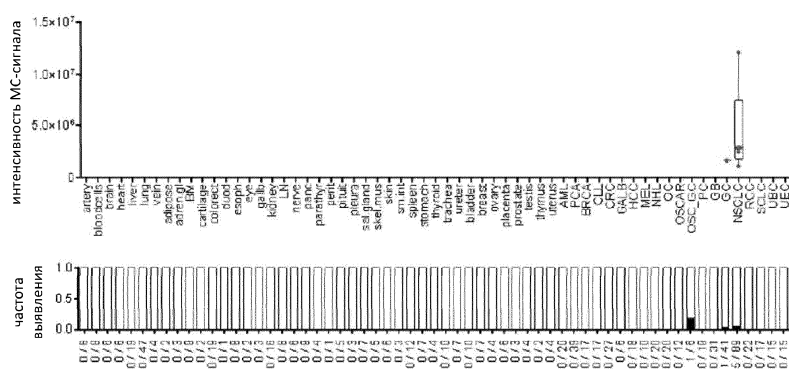
Фиг. 4N

SEQ ID NO: 117: CABY-001



Фиг. 4I

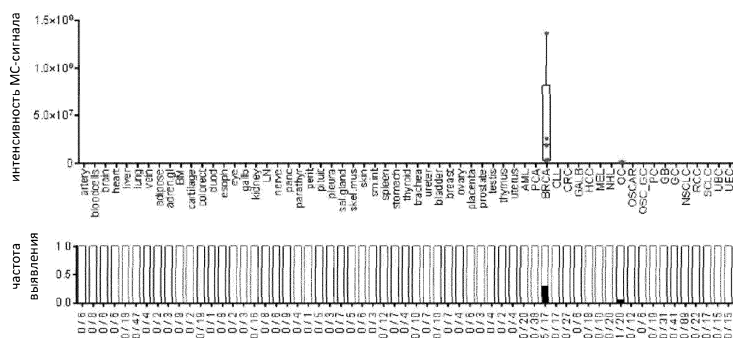
SEQ ID NO: 153: CT83-001



Ткани (слева направо): Нормальные образцы: артерия; клетки крови; головной мозг; сердце; печень; легкие; вена; жировая ткань; надпочечная железа; костный мозг; толстая и прямая кишка; двенадцатиперстная кишка; пищевод; желчный пузырь; лимфатический узел; поджелудочная железа; паращитовидная железа; брюшина; гипофиз; слюнная железа; скелетная мышца; кожа; тонкая кишка; селезенка; желудок; щитовидная железа; трахея; мочеточник; мочевой пузырь; молочная железа; яичник; плацента; предстательная железа; семенник; вилочковая железа; матка. Опухолевые образцы: острый миелоидный лейкоз (AML); рак предстательной железы (CA); рак молочной железы (BRCA); хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL); колоректальный рак (CRC); рак желчного пузыря (GALB); гепатоклеточная карцинома (HCC); меланома (MEL); неходжкинская лимфома (NHL); рак яичника (OC); рак пищевода (OSCAR); рак пищевода / желудка (OSC_GC); рак поджелудочной железы (C); глиобластома (GB); рак желудка (GC); немелкоклеточный рак легких (NSCLC); почечноклеточная карцинома (RCC); мелкоклеточный рак легких (SCLC); карцинома мочевого пузыря (UBC); рак эндометрия матки (UEC)

Фиг. 4J

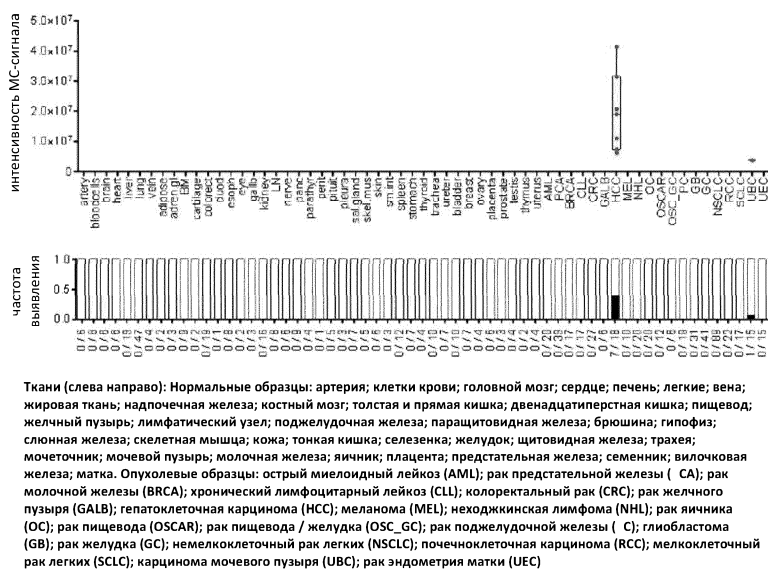
SEQ ID NO: 155: CYP4Z-001



Ткани (слева направо): Нормальные образцы: артерия; клетки крови; головной мозг; сердце; печень; легкие; вена; жировая ткань; надпочечная железа; костный мозг; толстая и прямая кишка; двенадцатиперстная кишка; пищевод; желчный пузырь; лимфатический узел; поджелудочная железа; паращитовидная железа; брюшина; гипофиз; слюнная железа; скелетная мышца; кожа; тонкая кишка; селезенка; желудок; щитовидная железа; трахея; мочеточник; мочевой пузырь; молочная железа; яичник; плацента; предстательная железа; семенник; вилочковая железа; матка. Опухолевые образцы: острый миелоидный лейкоз (AML); рак предстательной железы (CA); рак молочной железы (BRCA); хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL); колоректальный рак (CRC); рак желчного пузыря (GALB); гепатоклеточная карцинома (HCC); меланома (MEL); неходжкинская лимфома (NHL); рак яичника (OC); рак пищевода (OSCAR); рак пищевода / желудка (OSC_GC); рак поджелудочной железы (C); глиобластома (GB); рак желудка (GC); немелкоклеточный рак легких (NSCLC); почечноклеточная карцинома (RCC); мелкоклеточный рак легких (SCLC); карцинома мочевого пузыря (UBC); рак эндометрия матки (UEC)

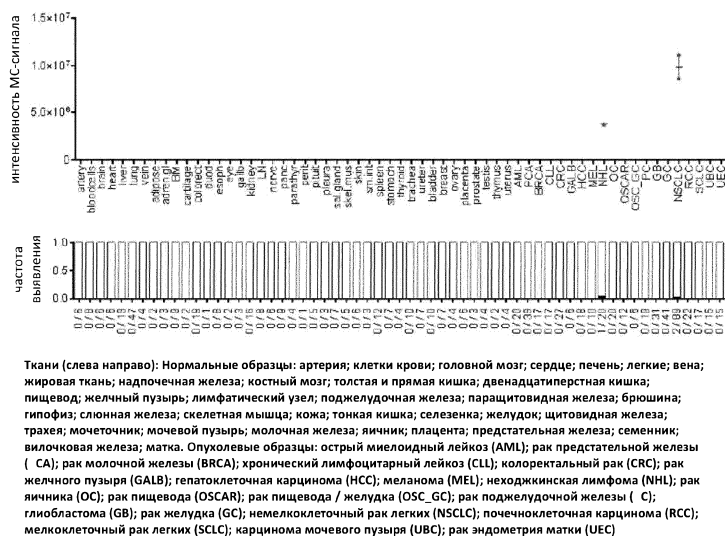
Фиг. 4K

SEQ ID NO: 157: DCAF4L2-001



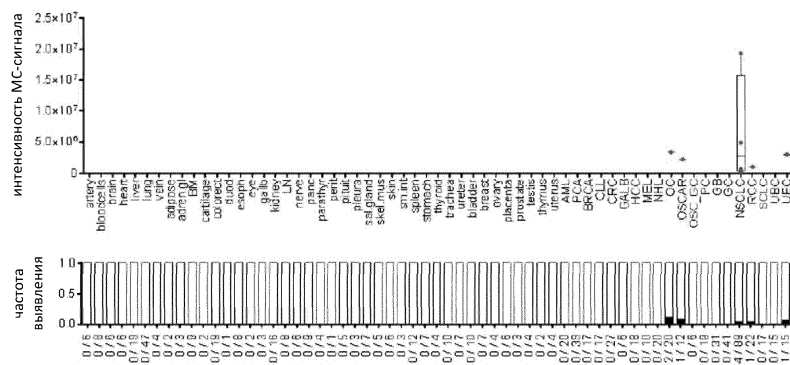
Фиг. 4L

SEQ ID NO: 168: NORMAD1-001



Фиг. 4M

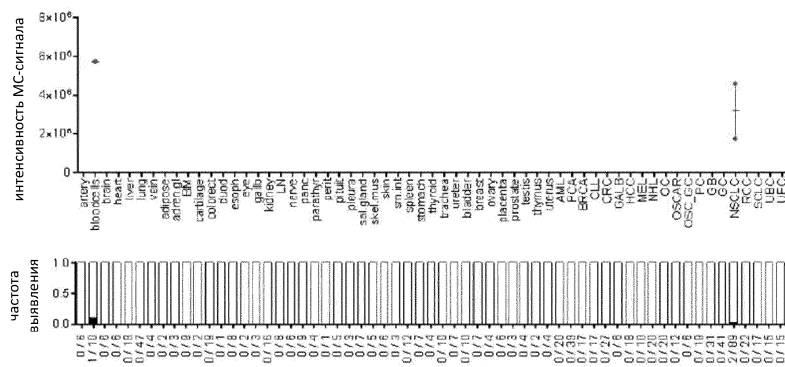
SEQ ID NO: 233: ZFP42-001



Ткани (слева направо): Нормальные образцы: артерия; клетки крови; головной мозг; сердце; печень; легкие; вена; жировая ткань; надпочечная железа; костный мозг; толстая и прямая кишка; двенадцатиперстная кишка; пищевод; желчный пузырь; лимфатический узел; поджелудочная железа; паращитовидная железа; брюшина; гипофиз; слюнная железа; скелетная мышца; кожа; тонкая кишка; селезенка; желудок; щитовидная железа; трахея; мочеточник; мочевой пузырь; молочная железа; яичник; плацента; предстательная железа; семенник; вилочковая железа; матка. Опухолевые образцы: острый миелоидный лейкоз (AML); рак предстательной железы (CA); рак молочной железы (BRCA); хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL); колоректальный рак (CRC); рак желчного пузыря (GALB); гепатоклеточная карцинома (HCC); меланома (MEL); неходжкинская лимфома (NHL); рак яичника (OC); рак пищевода (OSCAR); рак пищевода / желудка (OSC_GC); рак поджелудочной железы (C); глиобластома (GB); рак желудка (GC); немелкоклеточный рак легких (NSCLC); почечноклеточная карцинома (RCC); мелкоклеточный рак легких (SCLC); карцинома мочевого пузыря (UBC); рак эндометрия матки (UEC)

Фиг. 4N

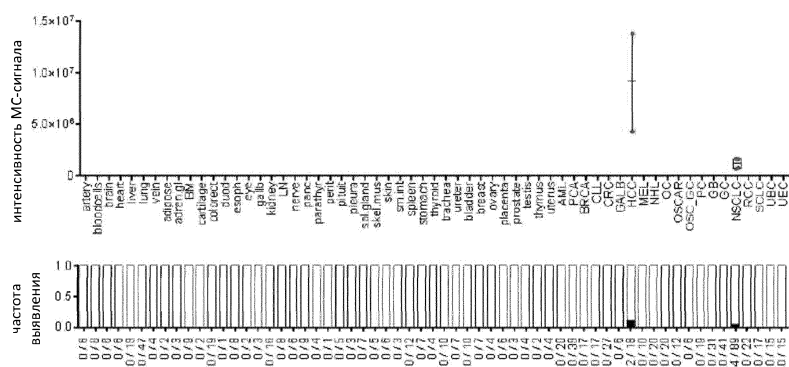
SEQ ID NO: 245: MAGEA4-003



Ткани (слева направо): Нормальные образцы: артерия; клетки крови; головной мозг; сердце; печень; легкие; вена; жировая ткань; надпочечная железа; костный мозг; толстая и прямая кишка; двенадцатиперстная кишка; пищевод; желчный пузырь; лимфатический узел; поджелудочная железа; паращитовидная железа; брюшина; гипофиз; слюнная железа; скелетная мышца; кожа; тонкая кишка; селезенка; желудок; щитовидная железа; трахея; мочеточник; мочевой пузырь; молочная железа; яичник; плацента; предстательная железа; семенник; вилочковая железа; матка. Опухолевые образцы: острый миелоидный лейкоз (AML); рак предстательной железы (CA); рак молочной железы (BRCA); хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL); колоректальный рак (CRC); рак желчного пузыря (GALB); гепатоклеточная карцинома (HCC); меланома (MEL); неходжкинская лимфома (NHL); рак яичника (OC); рак пищевода (OSCAR); рак пищевода / желудка (OSC_GC); рак поджелудочной железы (C); глиобластома (GB); рак желудка (GC); немелкоклеточный рак легких (NSCLC); почечноклеточная карцинома (RCC); мелкоклеточный рак легких (SCLC); карцинома мочевого пузыря (UBC); рак эндометрия матки (UEC)

Фиг. 4O

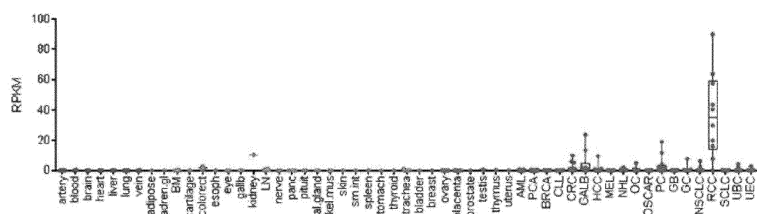
SEQ ID NO: 274: IGF-004



Ткани (слева направо): Нормальные образцы: артерия; клетки крови; головной мозг; сердце; печень; легкие; вена; жировая ткань; надпочечная железа; костный мозг; толстая и прямая кишка; двенадцатиперстная кишка; пищевод; желчный пузырь; лимфатический узел; поджелудочная железа; паразитовидная железа; брюшина; гипофиз; слюнная железа; скелетная мышца; кожа; тонкая кишка; селезенка; желудок; щитовидная железа; трахея; мочеточник; мочевой пузырь; молочная железа; яичник; плацента; предстательная железа; семенник; вилочковая железа; матка. Опухолевые образцы: острый миелоидный лейкоз (AML); рак предстательной железы (CA); рак молочной железы (BRCA); хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL); колоректальный рак (CRC); рак желчного пузыря (GALB); гепатоклеточная карцинома (HCC); меланома (MEL); неходжкинская лимфома (NHL); рак яичника (OC); рак пищевода (OSCAR); рак пищевода / желудка (OSC_GC); рак поджелудочной железы (C); глиобластома (GB); рак желудка (GC); немелкоклеточный рак легких (NSCLC); почечноклеточная карцинома (RCC); мелкоклеточный рак легких (SCLC); карцинома мочевого пузыря (UBC); рак эндометрия матки (UEC)

Фиг. 4R

SEQ ID NO: 11: HAVCR1-001

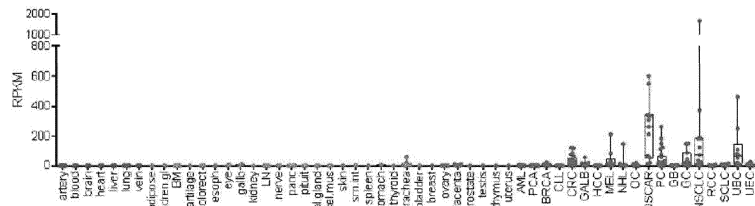


Ткани (слева направо): нормальные образцы: артерия (rt r), клетки крови (bl d lls), головной мозг (br in), сердце (h rt), печень (liv r), легкие (lung), вена (v in), жировая ткань (di s), надпочечная железа (dr n l g), костный мозг (BM), хрящевая ткань (rt il g), толстая и прямая кишка (l r t), пищевод (s h), глаз (), желчный пузырь (g llb), почка (kidn), лимфатический узел (LN), нерв (n rv), поджел. жел. (n), гипофиз (ituit), слюнная жел. (s l. gl nd), скелетн. мышца (sk l. mus), кожа (skin), тонкая кишка (sm.int), селезенка (s l n), желудок (st m h), щитовидн. жел. (th r id), трахея (tr h), мочевой пузырь (bl dd r), молочн. жел. (br st), яичник (v r), плацента (l nt), предст. жел. (r st t), семенник (t stis), вилочковая жел. (th mus), матка (ut rus)

Опухолевые образцы: острый миелоидный лейкоз (AML), рак предстательной жел. (CA), рак молочной жел. (BRCA), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), колорект. рак (CRC), рак желчного пузыря (GALB), гепатоклет. карцинома (HCC), меланома (MEL), неходжкинская лимфома (NHL), рак яичника (OC), рак пищевода (OSCAR), рак поджелуд. жел. (C), глиобластома (GB), рак желудка (GC), немелкоккл. рак легких (NSCLC), почечнокл. карцинома (RCC), мелкоккл. рак легких (SCLC), карцинома мочевого пузыря (UBC), рак эндометрия матки (UEC)

Фиг. 5A

SEQ ID NO: 14: MMP1-003

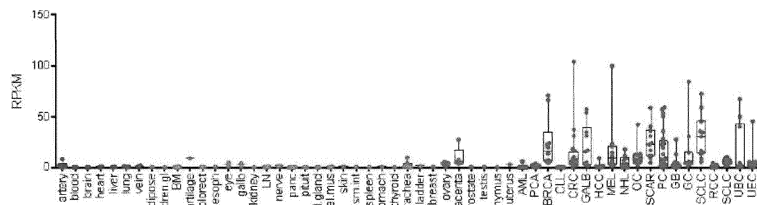


Ткани (слева направо): нормальные образцы: артерия (rt r), клетки крови (bl d lls), головной мозг (br in), сердце (h rt), печень (liv r), легкие (lung), вена (v in), жировая ткань (di s), надпочечная железа (dr n lgl), костный мозг (BM), хрящевая ткань (rtil g), толстая и прямая кишка (l r t), пищевод (s h), глаз (), желчный пузырь (g llb), почка (kidn), лимфатический узел (LN), нерв (n rv), поджел. жел. (n), гипофиз (ituit), слюнная жел. (s l. gl nd), скелетн. мышца (sk l. mus), кожа (skin), тонкая кишка (sm.int), селезенка (s l n), желудок (st m h), щитовидн. жел. (th r id), трахея (tr h), мочевого пузыря (bl dd r), молочн. жел. (br st), яичник (v r), плацента (l nt), предст. жел. (r st t), семенник (t stis), вилочковая жел. (th mus), матка (ut rus)

Опухолевые образцы: острый миелоидный лейкоз (AML), рак предстательной жел. (CA), рак молочной жел. (BRCA), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), колорект. рак (CRC), рак желчного пузыря (GALB), гепатоклет. карцинома (HCC), меланома (MEL), неходжкинская лимфома (NHL), рак яичника (OC), рак пищевода (OSCAR), рак поджелуд. жел. (C), глиобластома (GB), рак желудка (GC), немелкоккл. рак легких (NSCLC), почечнокл. карцинома (RCC), мелкоккл. рак легких (SCLC), карцинома мочевого пузыря (UBC), рак эндометрия матки (UEC)

Фиг. 5B

SEQ ID NO: 21: COL6A3-015

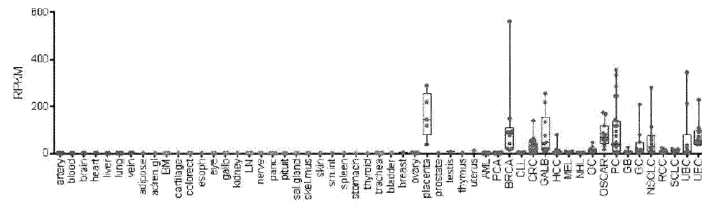


Ткани (слева направо): нормальные образцы: артерия (rt r), клетки крови (bl d lls), головной мозг (br in), сердце (h rt), печень (liv r), легкие (lung), вена (v in), жировая ткань (di s), надпочечная железа (dr n lgl), костный мозг (BM), хрящевая ткань (rtil g), толстая и прямая кишка (l r t), пищевод (s h), глаз (), желчный пузырь (g llb), почка (kidn), лимфатический узел (LN), нерв (n rv), поджел. жел. (n), гипофиз (ituit), слюнная жел. (s l. gl nd), скелетн. мышца (sk l. mus), кожа (skin), тонкая кишка (sm.int), селезенка (s l n), желудок (st m h), щитовидн. жел. (th r id), трахея (tr h), мочевого пузыря (bl dd r), молочн. жел. (br st), яичник (v r), плацента (l nt), предст. жел. (r st t), семенник (t stis), вилочковая жел. (th mus), матка (ut rus)

Опухолевые образцы: острый миелоидный лейкоз (AML), рак предстательной жел. (CA), рак молочной жел. (BRCA), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), колорект. рак (CRC), рак желчного пузыря (GALB), гепатоклет. карцинома (HCC), меланома (MEL), неходжкинская лимфома (NHL), рак яичника (OC), рак пищевода (OSCAR), рак поджелуд. жел. (C), глиобластома (GB), рак желудка (GC), немелкоккл. рак легких (NSCLC), почечнокл. карцинома (RCC), мелкоккл. рак легких (SCLC), карцинома мочевого пузыря (UBC), рак эндометрия матки (UEC)

Фиг. 5C

SEQ ID NO: 24: MMP-002

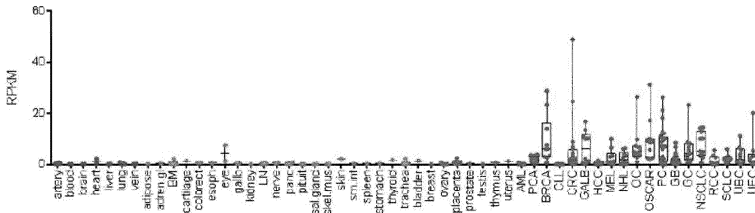


Ткани (слева направо): нормальные образцы: артерия (rt r), клетки крови (bl d lls), головной мозг (br in), сердце (h rt), печень (liv r), легкие (lung), вена (v in), жировая ткань (di s), надпочечная железа (dr n lgl), костный мозг (BM), хрящевая ткань (rtil g), толстая и прямая кишка (l r t), пищевод (s h), глаз (), желчный пузырь (g llb), почка (kidn), лимфатический узел (LN), нерв (n rv), поджел. жел. (n), гипофиз (ituit), слюнная жел. (s l. gl nd), скелетн. мышца (sk l. mus), кожа (skin), тонкая кишка (sm.int), селезенка (s l n), желудок (st m h), щитовидн. жел. (th r id), трахея (tr h), мочевого пузыря (bl dd r), молочн. жел. (br st), яичник (v r), плацента (l nt), предст. жел. (r st t), семенник (t stis), вилочковая жел. (th mus), матка (ut rus)

Опухолевые образцы: острый миелоидный лейкоз (AML), рак предстательной жел. (CA), рак молочной жел. (BRCA), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), колорект. рак (CRC), рак желчного пузыря (GALB), гепатоклет. карцинома (HCC), меланома (MEL), неходжкинская лимфома (NHL), рак яичника (OC), рак пищевода (OSCAR), рак поджелуд. жел. (C), глиобластома (GB), рак желудка (GC), немелкоккл. рак легких (NSCLC), почечнокл. карцинома (RCC), мелкоккл. рак легких (SCLC), карцинома мочевого пузыря (UBC), рак эндометрия матки (UEC)

Фиг. 5D

SEQ ID NO: 25: MXRA5-003

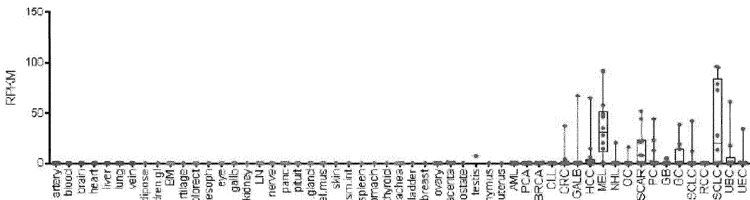


Ткани (слева направо): нормальные органы: артерия (r t r), клетки крови (bl d lls), головной мозг (br n), сердце (h rt), печень (lv r), легкие (lung), вена (v n), жировая ткань (d s), надпочечная железа (d r n lg), костный мозг (BM), хрящевая ткань (rt l g), толстая и прямая кишка (r t g), пищевод (h n), глаз (n), желчный пузырь (g llb), почка (kidn i), лимфатический узел (LN), нерв (n v), поджел. жел. (n i), гипофиз (tuit), слюнная железа (s i lg nd), скелет. мышца (sk i s m), кожа (skin), тонкая кишка (sm.it), селезенка (s i n), желудок (st m h), щитовидн. жел. (th i rt), трахея (tr h), мочевого пузыря (bl d d r), молочн. жел. (br st), яичник (v r), плацента (l nt i), предст. жел. (r st t), семенник (t stis), выш. дод. жел. (th sm), матка (ut rus)

Опухолевые образцы: острый миелоидный лейкоз (AML), рак предстательной жел. (СА), рак молочной жел. (BRCA), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), колорект. рак (CRC), рак желчного пузыря (GALB), гепатоцелл. карцинома (HCC), меланома (MEI), неходжкинская лимфома (NHL), рак яичника (OC), рак пищевода (OSCAR), рак поджелуд. жел. (С), глиобластома (GB), рак желудка (GC), немелкоккл. рак легких (NSCLC), почечнокл. карцинома (RCC), мелкоккл. рак легких (SCLC), карцинома мочевого пузыря (UCB), рак эндометрия матки (UCE)

Фиг. 5Е

SEQ ID NO: 40: MAGEA3-003

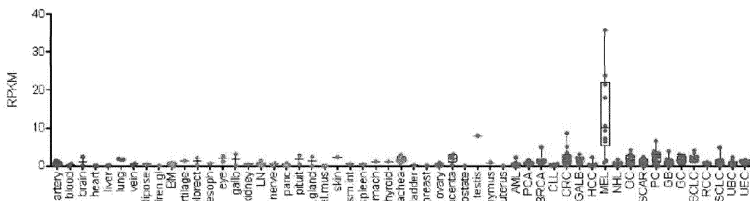


Ткани (сла, сла направо): нормальные органы: артерия (r t r), клетки крови (bl d lls), головной мозг (bl n), сердце (h rt), печень (lil r), легкие (lung), вена (v n), жировая ткань (di s), надпочечная железа (d r n gl), костный мозг (BM), хрящевая ткань (rt l g), толстая и прямая кишка (r t r), пищевод (bl n), глаз (n), желчный пузырь (g llb), почка (kidn), лимфатический узел (LN), нерв (n r), поджел. жел. (n), гипофиз (l tuit), слюнная железа (s i gl nd), скелеты, мышца (sk l m s), кожа (skin), тонкая кишка (sm.int), селезенка (s l n), желудок (st m h), щитовид. жел. (t r t), трахея (t r), мочевого пузыря (bl d r t), молочн. жел. (br st), яичник (v r), плацента (l nt), предст. жел. (r st t), семенник (t stis), вилочковая жел. (th mst), матка (ut rus)

Опухолевые образцы: острый миелоидный лейкоз (AML), рак предстательной жел. (CA), рак молочной жел. (BRCA), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), колорект. рак (CRC), рак желчного пузыря (GALB), гепатоцелл. карцинома (HCC), меланома (ME), немелкокш. лимфома (NHL), рак яичника (OC), рак пищевода (OSCAR), рак поджелуд. жел. (C), глиобластома (GB), рак желудка (GC), немелкокш. рак легких (NSCLC), почечн. карцинома (RCC), мелкокш. рак легких (SCLC), карцинома мочевого пузыря (UBC), рак эндометрия матки (UCE)

Фиг. 5F

SEQ ID NO: 85: FMN1-001

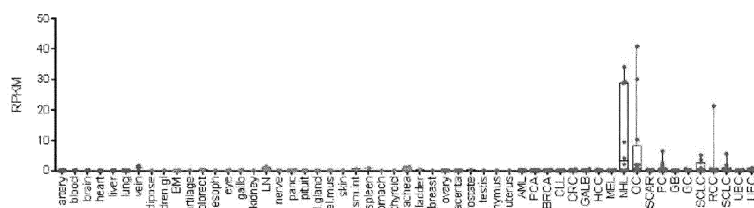


ткани (левая направо): нормальные органы: артерия (r t r), клетки крови (bl d lls), головной мозг (br n), сердце (h rt), печень (liv rt), легкие (lung), вена (v d s), жировая ткань (f d s), надпочечная железа (dr n gl), костный мозг (BM), хрящевая ткань (rttl g), толстая и прямая кишка (r t r), пищевод (s n), глаз (s), желчный пузырь (g lbl), почка (kid g), лимфатический узел (LN), нерв (n r v), поджел. жел. (n r), гипофиз (itu), слюнная железа (s l g nd), скелетн. мышца (sk l mus), кожа (sk n), тонкая кишка (sm-int), селезенка (s l n), желудок (st m gl), щитовидн. жел. (th r t), трахея (tr h), мочевого пузыря (bl dd r), молочн. жел. (br st), яичник (v r), плацента (l nt), предст. жел. (r st t), семенник (t stis), выдочка жел. (th mus), матка (ut rus)

Опухолевые образцы: острый миелоидный лейкоз (AML), рак предстательной жел. (CA), рак молочной жел. (BRCA), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), колорект. рак (CRC), рак желчного пузыря (GALB), гемагеликт. карцинома (HCC), меланома (MEL), неходжкинская лимфома (NHL), рак яичника (OC), рак пищевода (OSCAR), рак поджелуд. жел. (C), глиобластома (GB), рак желудка (GC), немелкоккл. рак легких (NSCLC), почечнокл. карцинома (RCC), мелкоккл. рак легких (SCLC), карцинома мочевого пузыря (UBC), рак эндометрия матки (UEC)

Фиг. 5G

SEQ ID NO: 89: HTR3A-001

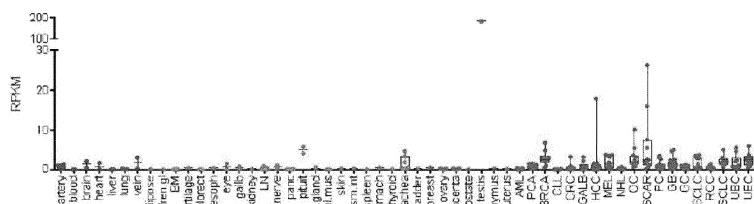


Ткани (слева направо): нормальные образцы: артерия (rt r), клетки крови (bl d lls), головной мозг (br in), сердце (h rt), печень (liv r), легкие (lung), вена (v in), жировая ткань (di s), надпочечная железа (dr n l gl), костный мозг (BM), хрящевая ткань (rtil g), толстая и прямая кишка (l r t), пищевод (s h), глаз (), желчный пузырь (g llb), почка (kidn), лимфатический узел (LN), нерв (n rv), поджел. жел. (n), гипофиз (ituit), слюнная жел. (s l. gl nd), скелетн. мышца (sk l. mus), кожа (skin), тонкая кишка (sm.int), селезенка (s l n), желудок (st m h), щитовидн. жел. (th r id), трахея (tr h), мочевого пузырь (bl dd r), молочн. жел. (br st), яичник (v r), плацента (l nt), предст. жел. (r st t), семенник (t stis), вилочковая жел. (th mus), матка (ut rus)

Опухолевые образцы: острый миелоидный лейкоз (AML), рак предстательной жел. (CA), рак молочной жел. (BRCA), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), колорект. рак (CRC), рак желчного пузыря (GALB), гепатоклет. карцинома (HCC), меланома (MEL), неходжкинская лимфома (NHL), рак яичника (OC), рак пищевода (OSCAR), рак поджелуд. жел. (C), глиобластома (GB), рак желудка (GC), немелкоккл. рак легких (NSCLC), почечнокл. карцинома (RCC), мелкоккл. рак легких (SCLC), карцинома мочевого пузыря (UBC), рак эндометрия матки (UEC)

Фиг. 5H

SEQ ID NO: 117: CABY-001

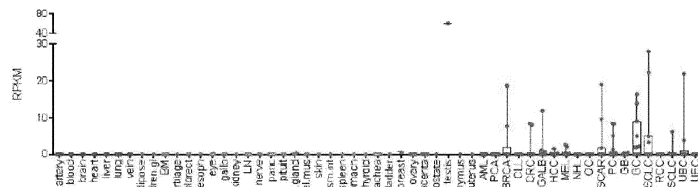


Ткани (слева направо): нормальные образцы: артерия (rt r), клетки крови (bl d lls), головной мозг (br in), сердце (h rt), печень (liv r), легкие (lung), вена (v in), жировая ткань (di s), надпочечная железа (dr n l gl), костный мозг (BM), хрящевая ткань (rtil g), толстая и прямая кишка (l r t), пищевод (s h), глаз (), желчный пузырь (g llb), почка (kidn), лимфатический узел (LN), нерв (n rv), поджел. жел. (n), гипофиз (ituit), слюнная жел. (s l. gl nd), скелетн. мышца (sk l. mus), кожа (skin), тонкая кишка (sm.int), селезенка (s l n), желудок (st m h), щитовидн. жел. (th r id), трахея (tr h), мочевого пузырь (bl dd r), молочн. жел. (br st), яичник (v r), плацента (l nt), предст. жел. (r st t), семенник (t stis), вилочковая жел. (th mus), матка (ut rus)

Опухолевые образцы: острый миелоидный лейкоз (AML), рак предстательной жел. (CA), рак молочной жел. (BRCA), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), колорект. рак (CRC), рак желчного пузыря (GALB), гепатоклет. карцинома (HCC), меланома (MEL), неходжкинская лимфома (NHL), рак яичника (OC), рак пищевода (OSCAR), рак поджелуд. жел. (C), глиобластома (GB), рак желудка (GC), немелкоккл. рак легких (NSCLC), почечнокл. карцинома (RCC), мелкоккл. рак легких (SCLC), карцинома мочевого пузыря (UBC), рак эндометрия матки (UEC)

Фиг. 5I

SEQ ID NO: 153: CT83-001

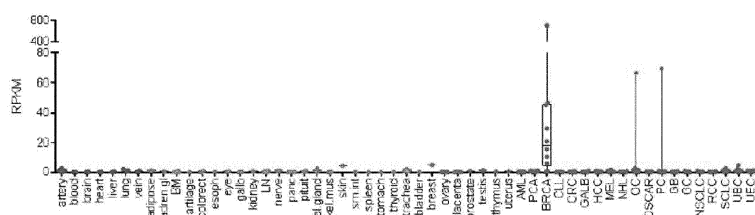


Ткани (слева направо): нормальные образцы: артерия (rt r), клетки крови (bl d lls), головной мозг (br in), сердце (h rt), печень (liv r), легкие (lung), вена (v in), жировая ткань (di s), надпочечная железа (dr n l gl), костный мозг (BM), хрящевая ткань (rtil g), толстая и прямая кишка (l r t), пищевод (s h), глаз (), желчный пузырь (g llb), почка (kidn), лимфатический узел (LN), нерв (n rv), поджел. жел. (n), гипофиз (ituit), слюнная жел. (s l. gl nd), скелетн. мышца (sk l. mus), кожа (skin), тонкая кишка (sm.int), селезенка (s l n), желудок (st m h), щитовидн. жел. (th r id), трахея (tr h), мочевого пузырь (bl dd r), молочн. жел. (br st), яичник (v r), плацента (l nt), предст. жел. (r st t), семенник (t stis), вилочковая жел. (th mus), матка (ut rus)

Опухолевые образцы: острый миелоидный лейкоз (AML), рак предстательной жел. (CA), рак молочной жел. (BRCA), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), колорект. рак (CRC), рак желчного пузыря (GALB), гепатоклет. карцинома (HCC), меланома (MEL), неходжкинская лимфома (NHL), рак яичника (OC), рак пищевода (OSCAR), рак поджелуд. жел. (C), глиобластома (GB), рак желудка (GC), немелкоккл. рак легких (NSCLC), почечнокл. карцинома (RCC), мелкоккл. рак легких (SCLC), карцинома мочевого пузыря (UBC), рак эндометрия матки (UEC)

Фиг. 5J

SEQ ID NO: 155: CYP4Z-001

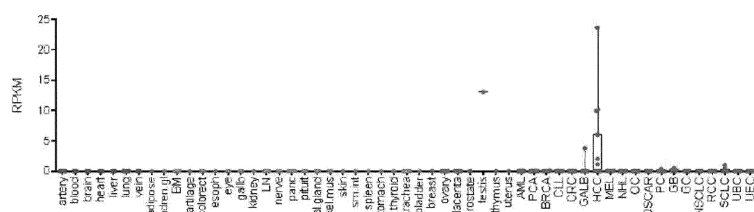


Ткани (слева направо): нормальные образцы: артерия (rt r), клетки крови (bl d lls), головной мозг (br in), сердце (h rt), печень (liv r), легкие (lung), вена (v in), жировая ткань (di s), надпочечная железа (dr n lgl), костный мозг (BM), хрящевая ткань (rtil g), толстая и прямая кишка (l r t), пищевод (s h), глаз (), желчный пузырь (g llb), почка (kidn), лимфатический узел (LN), нерв (n rv), поджел. жел. (n), гипофиз (ituit), слюнная жел. (s l gl nd), скелетн. мышца (sk l mus), кожа (skin), тонкая кишка (sm.int), селезенка (s l n), желудок (st m h), щитовидн. жел. (th r id), трахея (tr h), мочевого пузыря (bl dd r), молочн. жел. (br st), яичник (v r), плацента (l nt), предст. жел. (r st t), семенник (t stis), вилочковая жел. (th mus), матка (ut rus)

Опухолевые образцы: острый миелоидный лейкоз (AML), рак предстательной жел. (CA), рак молочной жел. (BRCA), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), колорект. рак (CRC), рак желчного пузыря (GALB), гепатоклет. карцинома (HCC), меланома (MEL), неходжкинская лимфома (NHL), рак яичника (OC), рак пищевода (OSCAR), рак поджелуд. жел. (C), глиобластома (GB), рак желудка (GC), немелкок. рак легких (NSCLC), почечнокл. карцинома (RCC), мелкок. рак легких (SCLC), карцинома мочевого пузыря (UBC), рак эндометрия матки (UEC)

Фиг. 5K

SEQ ID NO: 157: DCAF4L2-001

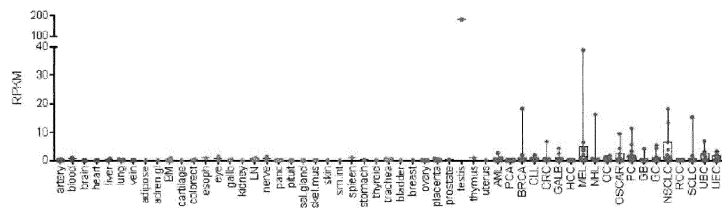


Ткани (слева направо): нормальные образцы: артерия (rt r), клетки крови (bl d lls), головной мозг (br in), сердце (h rt), печень (liv r), легкие (lung), вена (v in), жировая ткань (di s), надпочечная железа (dr n lgl), костный мозг (BM), хрящевая ткань (rtil g), толстая и прямая кишка (l r t), пищевод (s h), глаз (), желчный пузырь (g llb), почка (kidn), лимфатический узел (LN), нерв (n rv), поджел. жел. (n), гипофиз (ituit), слюнная жел. (s l gl nd), скелетн. мышца (sk l mus), кожа (skin), тонкая кишка (sm.int), селезенка (s l n), желудок (st m h), щитовидн. жел. (th r id), трахея (tr h), мочевого пузыря (bl dd r), молочн. жел. (br st), яичник (v r), плацента (l nt), предст. жел. (r st t), семенник (t stis), вилочковая жел. (th mus), матка (ut rus)

Опухолевые образцы: острый миелоидный лейкоз (AML), рак предстательной жел. (CA), рак молочной жел. (BRCA), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), колорект. рак (CRC), рак желчного пузыря (GALB), гепатоклет. карцинома (HCC), меланома (MEL), неходжкинская лимфома (NHL), рак яичника (OC), рак пищевода (OSCAR), рак поджелуд. жел. (C), глиобластома (GB), рак желудка (GC), немелкок. рак легких (NSCLC), почечнокл. карцинома (RCC), мелкок. рак легких (SCLC), карцинома мочевого пузыря (UBC), рак эндометрия матки (UEC)

Фиг. 5L

SEQ ID NO: 168: HORMAD1-001

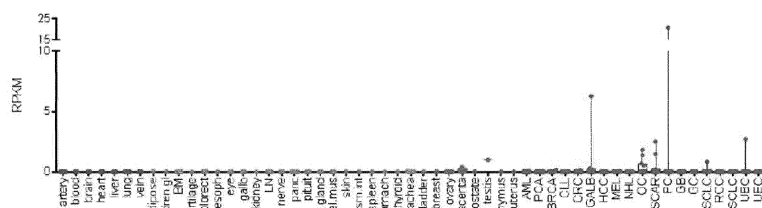


Ткани (слева направо): нормальные образцы: артерия (rt r), клетки крови (bl d lls), головной мозг (br in), сердце (h rt), печень (liv r), легкие (lung), вена (v in), жировая ткань (di s), надпочечная железа (dr n lgl), костный мозг (BM), хрящевая ткань (rtil g), толстая и прямая кишка (l r t), пищевод (s h), глаз (), желчный пузырь (g llb), почка (kidn), лимфатический узел (LN), нерв (n rv), поджел. жел. (n), гипофиз (ituit), слюнная жел. (s l gl nd), скелетн. мышца (sk l mus), кожа (skin), тонкая кишка (sm.int), селезенка (s l n), желудок (st m h), щитовидн. жел. (th r id), трахея (tr h), мочевого пузыря (bl dd r), молочн. жел. (br st), яичник (v r), плацента (l nt), предст. жел. (r st t), семенник (t stis), вилочковая жел. (th mus), матка (ut rus)

Опухолевые образцы: острый миелоидный лейкоз (AML), рак предстательной жел. (CA), рак молочной жел. (BRCA), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), колорект. рак (CRC), рак желчного пузыря (GALB), гепатоклет. карцинома (HCC), меланома (MEL), неходжкинская лимфома (NHL), рак яичника (OC), рак пищевода (OSCAR), рак поджелуд. жел. (C), глиобластома (GB), рак желудка (GC), немелкок. рак легких (NSCLC), почечнокл. карцинома (RCC), мелкок. рак легких (SCLC), карцинома мочевого пузыря (UBC), рак эндометрия матки (UEC)

Фиг. 5M

SEQ ID NO: 233: ZFP42-001

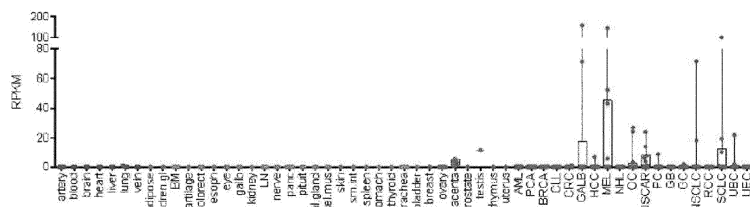


Ткани (слева направо): нормальные образцы: артерия (rt r), клетки крови (bl d lls), головной мозг (br in), сердце (h rt), печень (liv r), легкие (lung), вена (v in), жировая ткань (di s), надпочечная железа (dr n l gl), костный мозг (BM), хрящевая ткань (rt il g), толстая и прямая кишка (l r t), пищевод (s h), глаз (), желчный пузырь (g llb), почка (kidn), лимфатический узел (LN), нерв (n rv), поджел. жел. (n), гипофиз (ituit), слюнная жел. (s l. gl nd), скелетн. мышца (sk l. mus), кожа (skin), тонкая кишка (sm.int), селезенка (s l n), желудок (st m h), щитовидн. жел. (th r id), трахея (tr h), мочевого пузыря (bl dd r), молочн. жел. (br st), яичник (v r), плацента (l nt), предст. жел. (r st t), семенник (t stis), вилочковая жел. (th mus), матка (ut rus)

Опухолевые образцы: острый миелоидный лейкоз (AML), рак предстательной жел. (CA), рак молочной жел. (BRCA), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), колорект. рак (CRC), рак желчного пузыря (GALB), гепатоклет. карцинома (HCC), меланома (MEL), неходжкинская лимфома (NHL), рак яичника (OC), рак пищевода (OSCAR), рак поджелуд. жел. (C), глиобластома (GB), рак желудка (GC), немелкоккл. рак легких (NSCLC), почечнокл. карцинома (RCC), мелкоккл. рак легких (SCLC), карцинома мочевого пузыря (UBC), рак эндометрия матки (UEC)

Фиг. 5N

SEQ ID NO: 245: MAGEA4-003

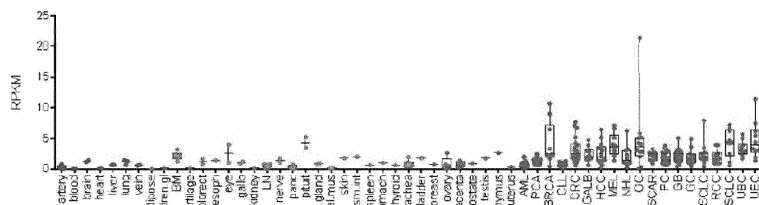


Ткани (слева направо): нормальные образцы: артерия (rt r), клетки крови (bl d lls), головной мозг (br in), сердце (h rt), печень (liv r), легкие (lung), вена (v in), жировая ткань (di s), надпочечная железа (dr n l gl), костный мозг (BM), хрящевая ткань (rt il g), толстая и прямая кишка (l r t), пищевод (s h), глаз (), желчный пузырь (g llb), почка (kidn), лимфатический узел (LN), нерв (n rv), поджел. жел. (n), гипофиз (ituit), слюнная жел. (s l. gl nd), скелетн. мышца (sk l. mus), кожа (skin), тонкая кишка (sm.int), селезенка (s l n), желудок (st m h), щитовидн. жел. (th r id), трахея (tr h), мочевого пузыря (bl dd r), молочн. жел. (br st), яичник (v r), плацента (l nt), предст. жел. (r st t), семенник (t stis), вилочковая жел. (th mus), матка (ut rus)

Опухолевые образцы: острый миелоидный лейкоз (AML), рак предстательной жел. (CA), рак молочной жел. (BRCA), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), колорект. рак (CRC), рак желчного пузыря (GALB), гепатоклет. карцинома (HCC), меланома (MEL), неходжкинская лимфома (NHL), рак яичника (OC), рак пищевода (OSCAR), рак поджелуд. жел. (C), глиобластома (GB), рак желудка (GC), немелкоккл. рак легких (NSCLC), почечнокл. карцинома (RCC), мелкоккл. рак легких (SCLC), карцинома мочевого пузыря (UBC), рак эндометрия матки (UEC)

Фиг. 5O

SEQ ID NO: 253: RAD54B-002

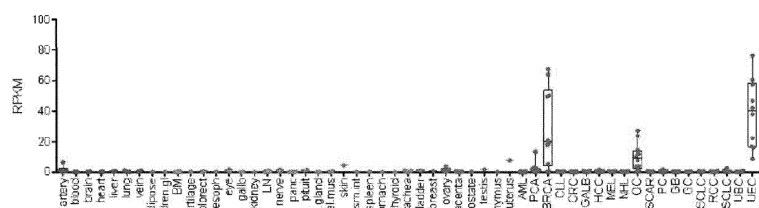


Ткани (слева направо): нормальные образцы: артерия (rt r), клетки крови (bl d lls), головной мозг (br in), сердце (h rt), печень (liv r), легкие (lung), вена (v in), жировая ткань (di s), надпочечная железа (dr n l gl), костный мозг (BM), хрящевая ткань (rt il g), толстая и прямая кишка (l r t), пищевод (s h), глаз (), желчный пузырь (g llb), почка (kidn), лимфатический узел (LN), нерв (n rv), поджел. жел. (n), гипофиз (ituit), слюнная жел. (s l. gl nd), скелетн. мышца (sk l. mus), кожа (skin), тонкая кишка (sm.int), селезенка (s l n), желудок (st m h), щитовидн. жел. (th r id), трахея (tr h), мочевого пузыря (bl dd r), молочн. жел. (br st), яичник (v r), плацента (l nt), предст. жел. (r st t), семенник (t stis), вилочковая жел. (th mus), матка (ut rus)

Опухолевые образцы: острый миелоидный лейкоз (AML), рак предстательной жел. (CA), рак молочной жел. (BRCA), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), колорект. рак (CRC), рак желчного пузыря (GALB), гепатоклет. карцинома (HCC), меланома (MEL), неходжкинская лимфома (NHL), рак яичника (OC), рак пищевода (OSCAR), рак поджелуд. жел. (C), глиобластома (GB), рак желудка (GC), немелкоккл. рак легких (NSCLC), почечнокл. карцинома (RCC), мелкоккл. рак легких (SCLC), карцинома мочевого пузыря (UBC), рак эндометрия матки (UEC)

Фиг. 5P

SEQ ID NO: 264: ESR1-001

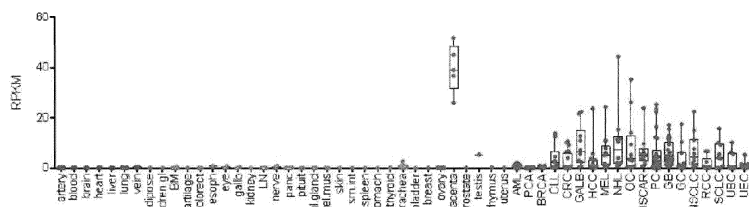


ткани (слева направо): нормальные образцы: артерия (rt r), клетки крови (bl d lls), головной мозг (br in), сердце (h rt), печень (liv r), легкие (lung), вена (v in), жировая ткань (di s), надпочечная железа (dr n lgl), костный мозг (BM), хрящевая ткань (rtil g), толстая и прямая кишка (l r t), пищевод (s h), глаз (n), желчный пузырь (g llb), почка (kidn), лимфатический узел (LN), нерв (n rv), поджел. жел. (n), гипофиз (ituit), слюнная жел. (s l. gl nd), скелетн. мышца (sk l. mus), кожа (skin), тонкая кишка (sm.int), селезенка (s l n), желудок (st m h), щитовидн. жел. (th r id), трахея (tr h), мочевого пузыря (bl dd r), молочн. жел. (br st), яичник (v r), плацента (l nt), предст. жел. (r st t), семенник (t stis), вилочковая жел. (th mus), матка (ut rus)

Опухолевые образцы: острый миелоидный лейкоз (AML), рак предстательной жел. (CA), рак молочной жел. (BRCA), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), колорект. рак (CRC), рак желчного пузыря (GALB), гепатоклет. карцинома (HCC), меланома (MEL), неходжкинская лимфома (NHL), рак яичника (OC), рак пищевода (OSCAR), рак поджелуд. жел. (C), глиобластома (GB), рак желудка (GC), немелкок. рак легких (NSCLC), почечнокл. карцинома (RCC), мелкок. рак легких (SCLC), карцинома мочевого пузыря (UBC), рак эндометрия матки (UEC)

Фиг. 5Q

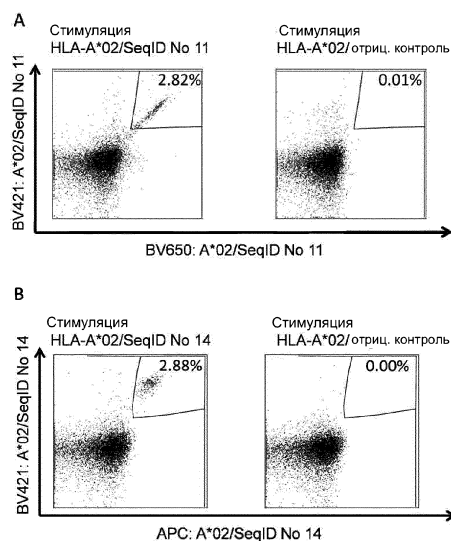
SEQ ID NO: 274: IGF-004

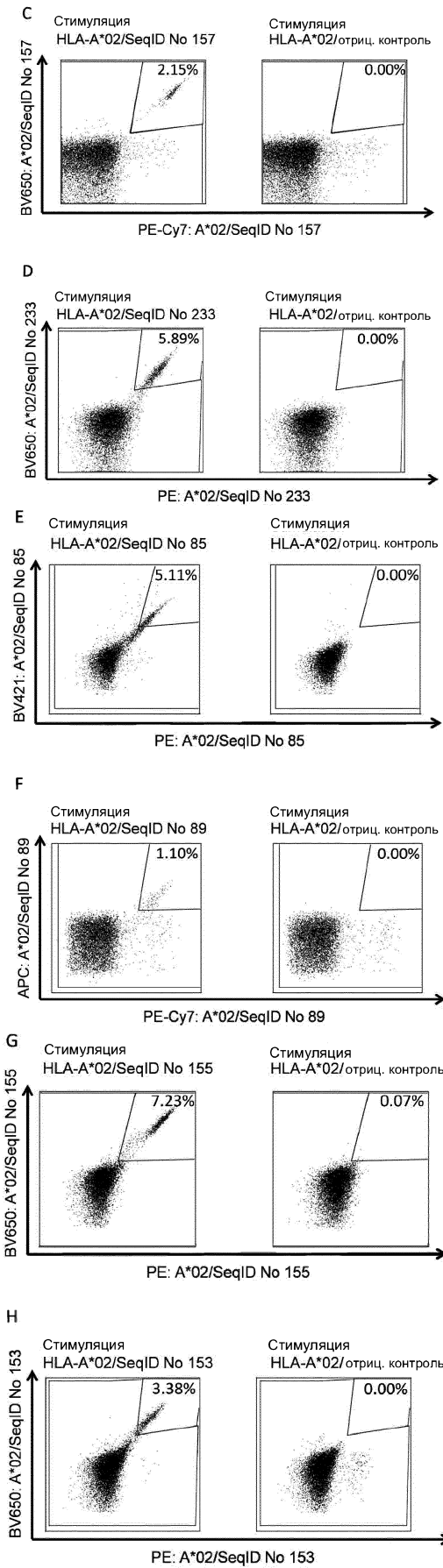


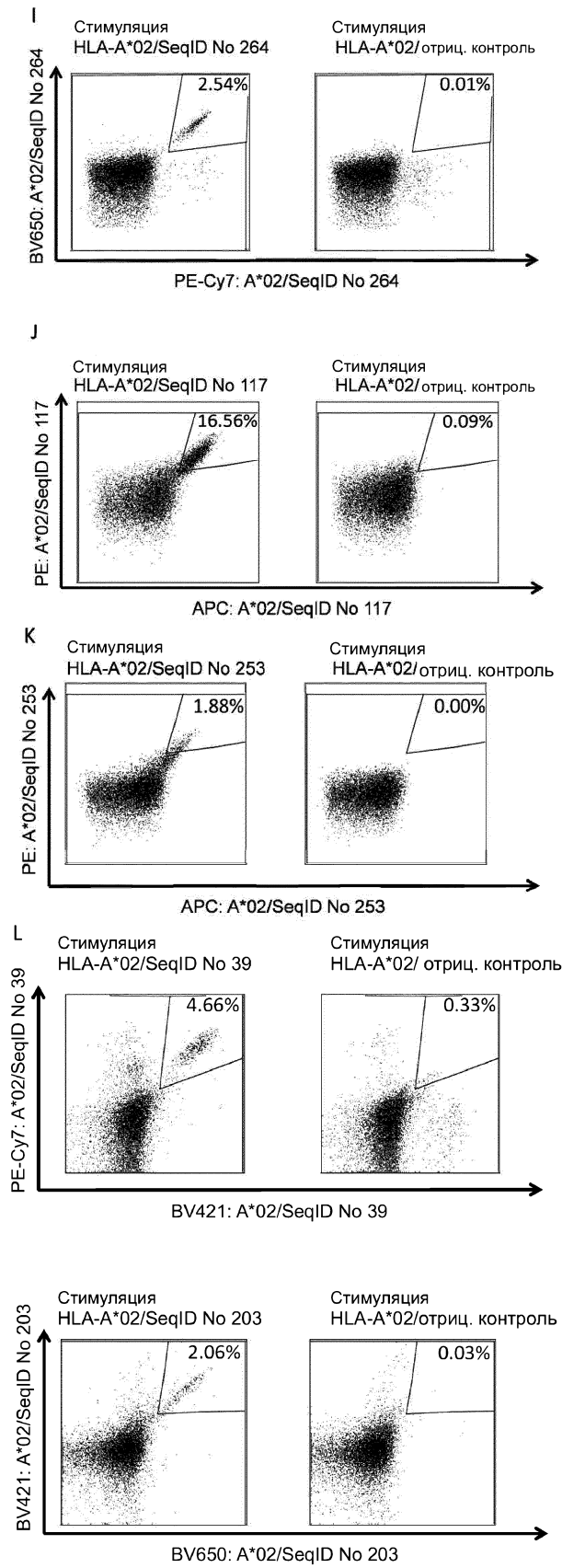
Ткани (слева направо): нормальные образцы: артерия (rt r), клетки крови (bl d lls), головной мозг (br in), сердце (h rt), печень (liv r), легкие (lung), вена (v in), жировая ткань (di s), надпочечная железа (dr n lgl), костный мозг (BM), хрящевая ткань (rtil g), толстая и прямая кишка (l r t), пищевод (s h), глаз (n), желчный пузырь (g llb), почка (kidn), лимфатический узел (LN), нерв (n rv), поджел. жел. (n), гипофиз (ituit), слюнная жел. (s l. gl nd), скелетн. мышца (sk l. mus), кожа (skin), тонкая кишка (sm.int), селезенка (s l n), желудок (st m h), щитовидн. жел. (th r id), трахея (tr h), мочевого пузыря (bl dd r), молочн. жел. (br st), яичник (v r), плацента (l nt), предст. жел. (r st t), семенник (t stis), вилочковая жел. (th mus), матка (ut rus)

Опухолевые образцы: острый миелоидный лейкоз (AML), рак предстательной жел. (CA), рак молочной жел. (BRCA), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), колорект. рак (CRC), рак желчного пузыря (GALB), гепатоклет. карцинома (HCC), меланома (MEL), неходжкинская лимфома (NHL), рак яичника (OC), рак пищевода (OSCAR), рак поджелуд. жел. (C), глиобластома (GB), рак желудка (GC), немелкок. рак легких (NSCLC), почечнокл. карцинома (RCC), мелкок. рак легких (SCLC), карцинома мочевого пузыря (UBC), рак эндометрия матки (UEC)

Фиг. 5R

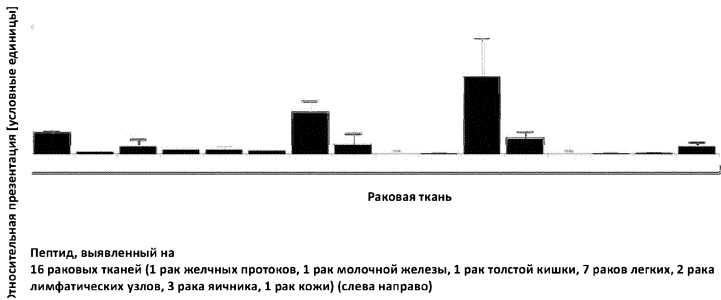






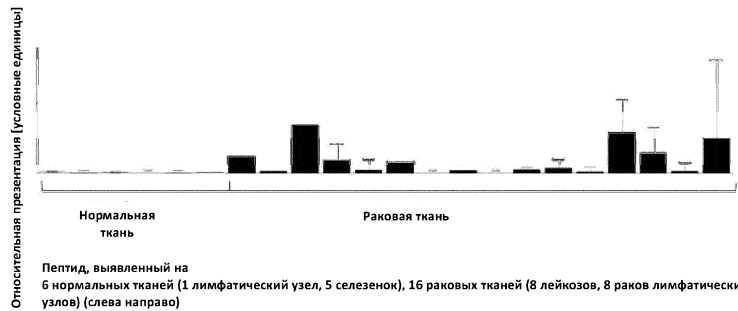
Фиг. 6

Пептид: **LIPFTIFM (A*02)**
SEQ ID NO: 43



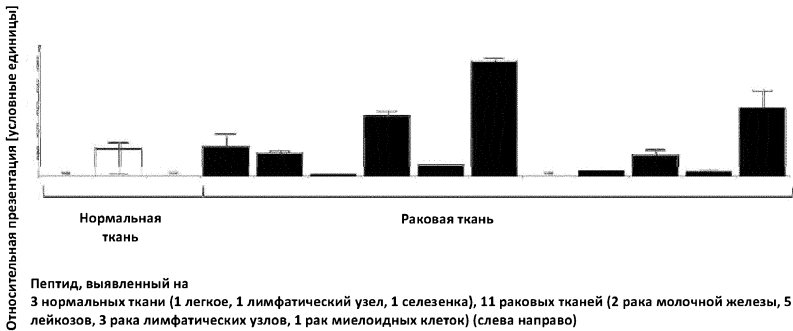
Фиг. 7А

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



Фиг. 7В

Пептид: **VILTSSPFL (A*02)**
SEQ ID NO: 156



Фиг. 7С



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2