



MD/EP 3291830 T2 2021.04.30

## REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3291830 (13) T2

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

## (12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2018 0258	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 04/2021, 2021.04.30
(22) Data de depozit: 2016.05.04	(80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 07/2021, 2021.02.17
(96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 16723966.4, 2016.05.04	(82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 04/2018, 2018.04.30
(97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3291830, 2018.03.14	
(31) Numărul cererii prioritare: 201507719; 201562157684 P	
(32) Data de depozit a cererii prioritare: 2015.05.06; 2015.05.06	
(33) Țara cererii prioritare: GB; US	
(71) Solicitant: IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH, DE	
(72) Inventatori: MAHR Andrea, DE; WEINSCHENK Toni, DE; WIEBE Anita, DE; FRITSCH Jens, DE; SINGH Harpreet, US; SCHOOR Oliver, DE	
(73) Titular: IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH, DE	
(74) Mandatar autorizat: FOCȘA Valentin	

(54) Noi peptide și combinații de peptide și eșafodaje ale acestora pentru utilizare în imunoterapie împotriva carcinomului colorectal (CRC) și a altor cancere

(57) Rezumat:

1

Prezenta invenție se referă la peptide, proteine, acizi nucleici și celule pentru utilizare în metode imunoterapeutice. În mod special, prezenta invenție se referă la imunoterapia cancerului. În plus, prezenta invenție se referă la epitopii peptidici ai celulelor T citotoxice asociate tumorii, singuri sau asociați cu alte peptide asociate tumorii, care pot servi, de exemplu, drept componente farmaceutice active ale formulărilor de vaccin care stimulează răspunsurile imunitare antitumorale sau pentru

2

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

Secvențe: 267

Revendicări: 16

Figuri: 4

MD/EP 3291830 T2 2021.04.30

**(54) Novel peptides and combination of peptides and scaffolds thereof for use in immunotherapy against colorectal carcinoma (CRC) and other cancers**

**(57) Abstract:**

1

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

2

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

Sequences: 267

Claims: 16

Fig.: 4

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

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

10 Prezentă invenție se referă la mai multe secvențe peptidice noi și variantele acestora derivate din moleculele HLA de clasă I ale celulelor tumorale umane care se pot folosi în formule de vaccin pentru inducerea de răspunsuri imunitare antitumorale sau drept ținte pentru dezvoltarea de compuși sau celule active din punct de vedere farmaceutic/imunologic.

**FUNDAMENTELE INVENȚIEI**

15 Cancerul colorectal (CRC) este al treilea cel mai frecvent cancer la bărbați și al doilea cel mai frecvent cancer la femei. La nivel global, CRC reprezintă aproximativ 10% din toate cazurile de cancer nou diagnosticate. În 2012 au fost diagnosticate 1,36 milioane de cazuri noi de CRC, cu 20 746.000 de cazuri la bărbați și 614.000 de cazuri la femei, rezultând un raport bărbați:femei de 1,2:1 (World Cancer Report, 2014). CRC este o boală a persoanelor în vârstă. Vârsta medie la momentul diagnosticării este de 68 de ani (SEER Stat facts, 2014).

Ratele de incidență variază geografic de aproximativ zece ori, cu similarități la bărbați și la femei. Cele mai mari rate de incidență la ambele sexe apar în Australia/Noua Zeelandă (rata standardizată în funcție de vârstă (ASR) = 45 la 100.000 de bărbați și ASR = 32 la 100.000 de femei). Ratele de incidență în Europa arată variații regionale mici și ASR = 38 la 100.000 de bărbați și ASR = 25 la 100.000 de femei. Cele mai scăzute rate de incidență la nivel mondial sunt în Africa de Vest, cu 4,5 la 100.000 de bărbați și 3,8 la 100.000 de femei (World Cancer Report, 2014).

30 Rata generală de supraviețuire la 5 ani pentru CRC este de aproximativ 65%. Cu toate acestea, ratele de supraviețuire depind de stadiul la momentul diagnosticării. Supraviețuirea la 5 ani pentru CRC localizat este de 89,8%, pentru CRC regional și la distanță de 70,5% și, respectiv, 12,9%. CRC este a patra cea mai frecventă cauză de deces prin cancer (694.000 de decese; 8,5%) (SEER Stat facts, 2014; World Cancer Report, 2014).

35 CRC este de obicei stadializat utilizându-se sistemul TNM, care încorporează informații despre dimensiunea tumorii primare (T), implicarea ganglionilor limfatici (N) și apariția metastazelor la distanță (M). Stadializarea UICC (Union Internationale Contre le Cancer) se bazează pe sistemul TNM și include date statistice pentru predicția prognosticului (Stintzing, 2014).

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

Vaccinurile peptidice au fost direcționate până acum împotriva antigenului carcinoembrionar (CEA), mucinei 1, EGFR, antigenului carcinomului cu celule scuamoase recunoscut de celule T 3 (SART3), gonadotropinei corionice beta-umane (beta-hCG), antigenului tumorii Wilms 1 (WT1), survivinei-2B, MAGE3, p53, proteinei degetului inelar 43 și translocazei membranei mitocondriale externe 34 (TOMM34) sau KRAS mutant. În mai multe studii clinice de fază I și II, pacienții au prezentat răspunsuri CTL specifice antigenului sau producție de anticorpi. În contrast cu răspunsurile imunologice, numeroși pacienți nu au beneficiat de vaccinuri peptidice la nivel clinic (Koido et al., 2013; Miyagi et al., 2001; Moulton et al., 2002; Okuno et al., 2011).

50 Vaccinurile cu celule dendritice cuprind Celule dendritice (DC) pulsate cu peptide derivate din TAA, cu lizate de celule tumorale, cu celule tumorale apoptotice sau cu ARN tumoral ori produse de fuziune a celulelor tumorale DC. În timp ce numeroși pacienți din studiile de fază I/II au prezentat răspunsuri imunologice specifice, doar o minoritate a avut un beneficiu clinic (Koido et al., 2013).

55 Vaccinurile cu celule tumorale întregi constau din celule tumorale autologe modificate pentru a secreta GM-CSF, modificate prin iradiere sau celule infectate cu virus, iradiate. Majoritatea pacienților nu au prezentat beneficii clinice în mai multe studii de fază II/III (Koido et al., 2013).

Virusul vaccinia sau poxvirusul aviari cu deficiență de replicare care codifică CEA, precum și B7.1, ICAM-1 și LFA-3 au fost utilizate ca vehicule în vaccinurile vectoriale virale în studii clinice de fază I. Un studiu diferit a folosit virusul canarypox nereplicant care codifică CEA și B7.1. Pe lângă

inducerea de răspunsuri la celule T specifice CEA, 40% dintre pacienți au prezentat răspunsuri clinice obiective (Horig et al., 2000; Kaufman et al., 2008).

Având în vedere efectele secundare severe și cheltuielile asociate cu tratarea cancerului, este necesară identificarea factorilor care pot fi utilizați în tratamentul cancerului în general și al CRC în special. De asemenea, este necesară identificarea factorilor care reprezintă biomarkeri pentru cancer în general și pentru CRC în special, conducând la îmbunătățirea diagnosticării cancerului, a evaluării prognosticului și a prezicerii succesului tratamentului.

Imunoterapia cancerului reprezintă o opțiune de țintire specifică a celulelor canceroase concomitent cu minimizarea efectelor secundare. Imunoterapia cancerului folosește existența antigenilor asociați tumorii.

Clasificarea curentă a antigenilor asociați tumorii (AAT) cuprinde următoarele grupuri principale:

a) Antigenii pentru cancer testicular: Primele AAT identificate vreodată care se pot recunoaște de către celulele T aparțin acestei clase, denumite inițial antigeni de cancer testicular (CT), deoarece exprimarea membrilor clasei se face în diferite tipuri histologice de tumori umane și, la nivelul țesuturilor naturale, are loc numai în spermatoците/spermatogoniile din testicul și, ocazional, în placentă. Deoarece celulele testiculare nu exprimă molecule HLA de clasă I și II, acești antigeni nu pot fi recunoscuți de celulele T în țesuturi normale și prin urmare pot fi considerați specifici tumorii din punct de vedere imunologic. Exemple bine cunoscute de antigeni CT sunt membrii familiei MAGE și NY-ESO-1.

b) Antigene de diferențiere: Aceste TAA sunt comune tumorilor și țesutului normal din care provin tumorile. Majoritatea antigenilor de diferențiere cunoscuți sunt identificați în melanoame și melanocite normale. Multe dintre aceste proteine corelate cu linia melanocitară sunt implicate în biosinteza melaninei și prin urmare nu sunt specifice tumorii, dar sunt totuși folosite pe scară largă pentru imunoterapia cancerului. Exemplele includ, fără a se limita la, tirozinază și Melan-A/MART-1 pentru melanom sau PSA pentru cancer prostatic.

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

d) Antigene specifice tumorilor: aceste TAA unice apar din mutații ale genelor normale (cum ar fi  $\beta$ -catenina, CDK4 etc.). Unele dintre aceste modificări moleculare sunt asociate cu transformări neoplazice și/sau progresie. Antigenii specifici tumorii sunt în general capabile să inducă un răspuns imunitar puternic fără a purta riscul unor reacții autoimune împotriva țesuturilor normale. Pe de altă parte aceste TAA sunt în majoritatea cazurilor relevante numai tumorii exacte din care au fost identificate și de obicei nu sunt comune mai multor tipuri individuale de tumori. Specificitatea (sau asocierea) cu tumoarea a unei peptide poate apărea, de asemenea, dacă peptida provine dintr-un exon din tumoare (asociat tumorii) în cazul izoformelor specifice tumorii (asociate tumorii).

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

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

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

Există două clase de molecule MHC, MHC de clasă I și MHC de clasă II. Moleculele MHC de clasă I sunt compuse dintr-un lanț greu alfa și din beta-2-microglobuline, molecule MHC de clasă II ale unui lanț alfa și ale unui lanț beta. Conformația lor tridimensională prezintă o incizură de legare care este folosită pentru interacțiuni necovalente cu peptide.

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

Complexele de peptidă și MHC de clasă I sunt recunoscute de celule T CD8- pozitive purtătoare de receptor de celule T (TCR) adecvat, în timp ce complexele de peptidă și molecule MHC de clasă II sunt recunoscute de celule T helper CD4- pozitive cu TCR-ul adecvat. Este bine cunoscut faptul că TCR, peptida și MHC sunt prezente în raport stoechiometric 1:1:1.

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

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

Peptidele alungite (mai lungi) din descriere pot acționa ca epitopi activi ai MHC de clasă II.

Celulele T helper, activate de epitopii MHC de clasă II, joacă un rol important în modularea rolului efector al CTL în imunitatea antitumorală. Epitopii celulelor T care declanșează un răspuns din partea celulelor T helper de tip TH1 susțin funcțiile efectorii ale celulelor T killer CD8- pozitive, care includ funcții citotoxice îndreptate împotriva celulelor tumorale care prezintă pe suprafața celulară complexe MHC/peptide asociate tumorii. Astfel epitopii peptidei unei celule T helper asociate tumorii, singur sau asociat cu alte peptide asociate tumorii, poate servi ca ingredient farmaceutic activ al formulărilor de vaccin care ar stimula răspunsul imunitar antitumoral.

S-a demonstrat pe modele animale (mamifere), de exemplu șoarece, că până și în absența limfocitelor T CD8 pozitive, celulele T CD4- pozitive sunt suficiente pentru inhibarea manifestărilor tumorale prin inhibarea angiogenezei prin secreția de interferon gamma ( $IFN\gamma$ ) (Beatty and Paterson, 2001; Mumberg et al., 1999). Există dovezi pentru celule T CD4 ca efectori antitumorali direcți (Braumuller et al., 2013; Tran et al., 2014).

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

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

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

În cazul reacțiilor imunitare dependente de MHC de clasă I, peptidele nu numai că se pot lega de anumite molecule MHC de clasă I exprimate de celulele tumorale, dar trebuie să fie și recunoscute ulterior de celulele T care prezintă receptori specifici pentru celulele T (TCR).

Pentru ca proteinele să fie recunoscute de limfocitele T ca antigeni specifici tumorii sau asociați tumorii, și pentru a putea fi utilizate în terapie, trebuie îndeplinite anumite condiții prealabile. Antigenul trebuie să fie exprimat preponderent în celulele tumorale, și deloc sau nici măcar în cantități mici în țesuturile sănătoase. Într-o realizare preferată, peptida trebuie să fie supraprezentată de celulele

tumorale comparativ cu țesuturile sănătoase normale. Este, de asemenea, de dorit ca respectivul antigen să nu fie prezent într-un singur tip de tumoare, și să fie prezent în concentrații mari (de exemplu, număr de copii per celulă pentru respectiva peptidă). Antigenii specifici tumorii și asociații tumorii sunt adesea derivate din proteine implicate direct în transformarea unei celule normale într-o celulă tumorală datorită funcției lor, de exemplu, în controlul ciclului celular sau suprimarea apoptozei. Suplimentar, țintele din aval pentru proteinele care cauzează direct transformarea pot fi reglate în sens crescător și prin urmare pot fi asociate indirect tumorii. Aceste antigene asociate indirect tumorii pot fi de asemenea ținta unei abordări de tip vaccinare (Singh-Jasuja et al., 2004). Este esențială prezența epitopilor în secvența de aminoacizi a antigenului pentru a se asigura faptul că o astfel de peptidă („peptidă imunogenă”), fiind derivată dintr-un antigen asociat tumorii, duce la un răspuns *in vitro* sau *in vivo* al celulelor T.

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

Prin urmare, TAA sunt un punct de plecare pentru dezvoltarea unei terapii bazate pe celule T, incluzând, însă nelimitându-se la vaccinuri tumorale. Metodele pentru identificarea și caracterizarea TAA sunt bazate, de obicei, pe utilizarea de celule T care se pot izola de la pacienți sau subiecți sănătoși sau sunt bazate pe generarea de profiluri diferențiate sau tipare de exprimare diferențiate pentru peptide între tumori și țesuturi normale. Cu toate acestea, identificarea genelor supraexprimate în țesuturi tumorale sau linii celulare tumorale umane sau exprimate selectiv în astfel de țesuturi sau linii celulare nu asigură informații precise asupra utilizării antigenilor care se transcriu din aceste gene într-un tratament imunitar. Aceasta deoarece numai o subpopulație individuală de epitopi ai acestor antigeni este adecvată pentru o astfel de aplicație, deoarece o linie de celule T cu TCR corespunzător trebuie să fie prezentă iar toleranța imunologică pentru acest anumit epitop trebuie să fie absentă sau minimală. Într-un exemplu foarte preferat este, deci, important să se selecteze numai acele peptide prezentate peste sau selectiv împotriva cărora se poate găsi o celulă T funcțională și/sau proliferantă. Astfel de celule T funcționale sunt definite ca celule T care, la stimularea cu un anumit antigen, pot fi extinse clonal și pot executa funcții efectoare („celule T efectoare”).

În cazul țintirii peptidei-MHC de către TCR-uri specifice (de exemplu, TCR solubile) și anticorpi sau alte molecule de legare (eșafodaje) descrise în prezentul document, imunogenitatea peptidelor subiacente este secundară. În aceste cazuri, prezentarea este factorul determinant.

WO 2015/018805 A1 descrie peptide care au capacitatea de a se lega de o moleculă a complexului major de histocompatibilitate (MHC) uman de clasă I sau II. WO 2009/015842A2 se referă la peptide derivate din antigeni asociați tumorii care sunt capabili să se lege de complexe MHC. Kristina Stenstedt, K., et al. (Anticancer research 32(9):3869-74) se referă la utilizarea exprimării enzimei citocromului P450 2W1 (CYP2W1) ca marker de prognostic pentru cancerul de colon. WO 2004/037282 se referă la utilizarea enzimei citocromului P450 CYP2W1 și a promotorului acestuia ca țintă medicamentoasă pentru terapia cancerului, precum și la metodele de screening pentru obținerea agenților terapeutici pentru terapia cancerului și agenții terapeutici care conțin fragmente care prezintă afinitate de legare pentru CYP2W1.

#### REZUMATUL INVENȚIEI

Prezenta invenție se referă la o peptidă care cuprinde secvența de aminoacid din SEQ ID NO 22, așa cum este definită în Revendicarea 1 anexată. Alte aspecte ale invenției sunt definite în revendicările anexate.

Intr-un prim aspect se descrie o peptidă care cuprinde o secvență aminoacidică selectată din grupul format din SEQ ID NO 1 până la SEQ ID NO: 191 sau o variantă de secvență a acestuia care este de cel puțin 77%, de preferință de cel puțin 88%, omologă (de preferință cel puțin 77% sau cel puțin 88% identică) cu SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 191, în care varianta menționată se leagă de MHC și/sau induce celule T care reacționează încrucișat cu peptida menționată, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia, în care peptida menționată nu este polipeptida de bază cu lungime completă.

Este descrisă, de asemenea, o peptidă care cuprinde o secvență care este selectată din grupul format din SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 191 sau o variantă a acesteia care este de cel puțin 77%, de preferință de cel puțin 88%, omologă (de preferință cel puțin 77% sau cel puțin 88% identică) cu SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 191, în care peptida menționată sau varianta acesteia are o lungime totală între 8 și 100, de preferință între 8 și 30 și, cel mai preferat, între 8 și 14 aminoacizi.

Tabelele următoare prezintă peptida în conformitate cu prezenta descoperire, valorile lor SEQ ID NO: respective și gena-sursă (subiacentă) prospectivă pentru această peptidă. Peptida din Tabelul 1 se leagă la HLA-A\*02. Tabelul 2 este, de asemenea, util în diagnosticul și/sau tratamentul

diferitelor alte malignități care implică o supraexprimare sau o supraprezentare a polipeptidei respective.

Tabelul 1: Peptida in conformitate cu prezenta invenție

SEQ ID NO:	Secvență	ID-uri gene	Simboluri oficiale de gene
22	GLIDEVMVL	54905	CYP2W1

5 În plus, sunt dezvăluite în general peptidele descrise pentru utilizare în tratamentul bolilor proliferative, cum ar fi, de exemplu, cancerul pulmonar, cancerul cerebral, cancerul de stomac, cancerul renal, cancerul hepatic, cancerul pancreatic, cancerul de prostată, leucemia, cancerul de glandă mamară, carcinomul cu celule Merkel (MCC), melanomul, cancerul ovarian și cancerul esofagian.

10 Preferate în mod special sunt peptidele – singure sau în combinație – în conformitate cu prezenta descoperire selectate din grupul format din SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 191. Mai preferate sunt peptidele – singure sau în combinație – selectate din grupul format din SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 68 (vezi Tabelul 1) și utilizările acestora în imunoterapia pentru CRC, cancer pulmonar, cancer cerebral, cancer de stomac, cancer renal, cancer hepatic, cancer pancreatic, cancer de prostată, leucemie, cancer de glandă mamară, carcinom cu celule Merkel, melanom, cancer ovarian și cancer esofagian și, de preferință, CRC.

15 Cele mai preferate sunt peptidele – singure sau în combinație – selectate din grupul format din SEQ ID NO: 1, 3, 6, 11, 13, 16, 18, 19, 22, 23, 24, 26, 31, 32, 34, 37, 40, 44, 45, 59, 67, 71, 82, 87, 88, 100, 103, 105, 113, 123, 124, 126, 129, 131, 132, 133, 135, 137, 140, 142, 150, 152, 153 și SEQ ID NO: 166 și utilizările acestora în imunoterapia pentru CRC, cancer pulmonar, cancer cerebral, cancer de stomac, cancer renal, cancer hepatic, cancer pancreatic, cancer de prostată, leucemie, cancer de glandă mamară, carcinom cu celule Merkel, melanom, cancer ovarian și cancer esofagian și, de preferință, CRC. Peptida din SEQ ID NO: 22 este, de asemenea, preferată în mod special pentru metodele descrise mai jos de generare a respectivilor receptori de celule T (TCR-uri).

25 Așa cum se arată în Tabelul 2 de mai jos, peptida în conformitate cu prezenta descoperire se găsește, de asemenea, pe alte tipuri de tumori și, prin urmare, poate fi utilizată, de asemenea, în imunoterapia altor indicații. Consultați, de asemenea, Figura 1D și Exemplul 1.

30 Tabelul 2: Peptida în conformitate cu prezenta invenție și utilizările sale specifice în alte boli proliferative, în special în alte boli canceroase. Tabelul arată peptida și pe ce tipuri de tumori suplimentare a fost găsită, prezentând supraprezentare (inclusiv prezentare specifică) pe mai mult de 5% din probele tumorale măsurate sau prezentare pe mai mult de 5% din probele tumorale măsurate cu un raport de medii geometrice tumoare vs. țesuturi normale mai mare de 3. Supraprezentarea este definită ca prezentare mai mare pe proba tumorală în comparație cu proba normală cu prezentarea cea mai mare. Țesuturile normale pe care a fost testată supraprezentarea au fost: țesut adipos, glandă suprarenală, celule sanguine, vas de sânge, măduvă osoasă, creier, esofag, ochi, vezică biliară, inimă, rinichi, intestin gros, ficat, plămân, ganglion limfatic, nerv, pancreas, glandă paratiroidă, peritoneu, hipofiză, pleură, glandă salivară, mușchi scheletic, piele, intestin subțire, splină, stomac, glandă tiroidă, trahee, ureter, vezică urinară.

SEQ ID NO:	Secvență	Entități suplimentare
22	GLIDEVMVL	Cancer de vezică biliară, cancer de cale biliară

40 NSCLC = cancer pulmonar cu celule mici, SCLC = cancer pulmonar cu celule mici, RCC = cancer renal, CRC = cancer de colon sau rect, GC = cancer stomacal, HCC = cancer hepatic, PC = cancer pancreatic, PrC = cancer de prostată, BRCA = cancer mamar, MCC = carcinom cu celule Merkel, OC = cancer ovarian, NHL = limfom non-Hodgkin, AML = leucemie mieloidă acută, CLL = leucemie limfocitară cronică.

45 Astfel, un alt aspect al prezentei descoperiri se referă la utilizarea peptidelor descrise în prezentul document pentru tratamentul – de preferință combinat – al unei boli proliferative selectate din grupul de CRC, cancer pulmonar, cancer cerebral, cancer de stomac, cancer renal, cancer hepatic, cancer pancreatic, cancer de prostată, leucemie, cancer de glandă mamară, carcinom cu celule Merkel, melanom, cancer ovarian și cancer esofagian.

50 Prezenta descoperire se referă, în plus, la peptidele descrise în prezentul document care au capacitatea de a se lega la o moleculă a complexului major de histocompatibilitate (MHC) uman de clasă I sau – într-o formă alungită, cum ar fi o variantă de lungime – sau de clasă II.

Prezenta descoperire se referă și la peptidele descrise în prezentul document în care peptidele respective (fiecare) constau, în esență, dintr-o secvență de aminoacizi în conformitate cu SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 191.

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

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

Prezenta descoperire se referă în continuare la un acid nucleic care codifică peptidele descrise în prezentul document. Prezenta descoperire referă în continuare la acidul nucleic descris în prezentul document, care este ADN, ADNc, APN, ARN sau combinații ale acestora.

Prezenta descoperire se referă în continuare la un vector de exprimare care este capabil să exprime și/sau exprimă un acid nucleic așa cum este descris în prezentul document.

Prezenta descoperire se referă în continuare la o peptidă conform descrierii din prezentul document, un acid nucleic conform descrierii din prezentul document sau un vector de exprimare conform descrierii din prezentul document pentru utilizare în tratamentul bolilor și în medicină, în special în tratamentul cancerului.

Prezenta descoperire se mai referă la anticorpi care sunt specifici împotriva peptidelor descrise în prezentul document sau complexe ale peptidelor menționate în conformitate cu descrierea din prezentul document cu MHC și metode de realizare a acestora.

Prezenta descoperire se referă în continuare la receptori de celule T (TCR), în special TCR solubil (sTCR) și TCR clonate transformate în celule T autologe sau alogene și metode de realizare a acestora, precum și celule NK sau alte celule care poartă respectivul TCR sau care reacționează încrucișat cu TCR menționate.

Anticorpii și TCR sunt concretizări suplimentare ale utilizării imunoterapeutice a peptidelor în conformitate cu descrierea din prezentul document.

Prezenta descoperire se referă în continuare la o celulă gazdă cuprinzând un acid nucleic în conformitate cu descrierea din prezentul document sau un vector de exprimare descris anterior. Prezenta descoperire se referă în continuare la celula-gazdă în conformitate cu descrierea din prezentul document, care este o celulă prezentatoare de antigen și, de preferință, este o celulă dendritică.

Prezenta descoperire se referă în continuare la o metodă de producere a unei peptide în conformitate cu descrierea din prezentul document, metoda cuprinzând cultivarea celulei gazdă în conformitate cu descrierea din prezentul document și izolarea peptidei din celula gazdă menționată sau din mediul său de cultură.

Prezenta descoperire se referă în continuare la metoda menționată în conformitate cu prezenta descoperire în care antigenul este încărcat pe molecule de MHC de clasă I sau de clasă II exprimate pe suprafața unei celule prezentatoare de antigen adecvate sau a unei celule prezentatoare de antigen artificiale prin punerea în contact a unei cantități suficiente de antigen cu o celulă prezentatoare de antigen.

Prezenta descoperire se referă în continuare la metoda în conformitate cu prezenta descoperire în care celula prezentatoare de antigen cuprinde un vector de exprimare capabil să exprime respectiva peptidă care conține SEQ ID NO: 1 până la SQ ID NO: 191, de preferință conținând SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 68, sau o variantă de secvență de aminoacizi.

Prezenta descoperire se referă în continuare la celulele T activate produse prin metoda descrisă în prezentul document, în care celula T menționată recunoaște selectiv o celulă care exprimă o polipeptidă cuprinzând o secvență de aminoacizi în conformitate cu descrierea din prezentul document.

Prezenta descoperire se referă în continuare la o metodă de ucidere a celulelor țintă la un pacient la care celulele țintă exprimă aberant o polipeptidă cuprinzând orice secvență de aminoacizi în conformitate cu descrierea din prezentul document, metoda cuprinzând administrarea, la pacient, a unui număr eficace de celule T produse în conformitate cu descrierea din prezentul document.

Prezenta descoperire se referă, de asemenea, la utilizarea oricărei peptide descrise, acidul nucleic în conformitate cu prezenta descoperire, vectorul de exprimare în conformitate cu prezenta descoperire, celula în conformitate cu prezenta descoperire, limfocitul T activat, receptorul celulelor T sau anticorpii sau alte molecule de legare peptidică și/sau peptidă-MHC în conformitate cu prezenta descoperire ca medicament sau la fabricarea unui medicament. De preferință, respectivul medicament este activ împotriva cancerului.

De preferință, respectivul medicament este o terapie celulară, un vaccin sau o proteină bazată pe un TCR sau anticorp solubil.

Prezenta dezvăluire se referă în continuare la o utilizare descrisă în prezentul document, în care celulele canceroase menționate sunt CRC, cancer pulmonar, cancer cerebral, cancer de stomac, cancer renal, cancer hepatic, cancer pancreatic, cancer de prostată, leucemie, cancer de glandă mamară, carcinom cu celule Merkel (MCC), melanom, cancer ovarian și cancer esofagian și, de preferință, celule CRC.

Prezenta descoperire se referă în continuare la biomarkeri pe baza peptidelor descrise în prezentul document, numite aici „ținte”, care pot fi utilizate în diagnosticarea cancerului, de preferință CRC. Markerul poate fi supraprezentarea peptidei (peptidelor) în sine sau supraexprimarea genei (genelor) corespunzătoare. Markerii pot fi, de asemenea, utilizați pentru a prezice probabilitatea de succes a unui tratament, de preferință o imunoterapie, și, cel mai preferat, o imunoterapie care vizează aceeași țintă identificată de biomarker. De exemplu, un anticorp sau un TCR solubil poate fi utilizat pentru colorarea secțiunilor tumorii pentru detectarea prezenței unei peptide de interes în complex cu MHC.

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

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

Utilizările terapeutică și diagnostică împotriva cancerelor suplimentare sunt prezentate în următoarea descriere mai detaliată a produselor de exprimare subiacente (polipeptide) ale peptidelor în conformitate cu descoperirea.

CYP2W1 codifică un membru al superfamiliei citocromului P450 de enzime care sunt monooxigenaze ce catalizează numeroase reacții implicate în metabolismul medicamentelor și în sinteza colesterolului, a steroizilor și a altor lipide (RefSeq, 2002). CYP2W1 este supraexprimat într-o varietate de tipuri de cancer uman, inclusiv cancer hepatocelular, colorectal și gastric. Supraexprimarea CYP2W1 este asociată cu progresia tumorii și supraviețuirea slabă (Aung et al., 2006; Gomez et al., 2010; Zhang et al., 2014e). Datorită exprimării specifice tumorii, CYP2W1 este o țintă interesantă a medicamentului sau un activator enzimatic al promedicamentelor în timpul terapiei anticancer (Karlgen și Ingelman-Sundberg, 2007; Nishida et al., 2010).

#### **DESCRIEREA DETALIATĂ A INVENTEI**

Stimularea unui răspuns imunitar depinde de prezența unor antigeni recunoscuți ca străini de către sistemul imunitar al gazdei. Descoperirea antigenilor asociați tumorilor a creat posibilitatea de a folosi sistemul imunitar al gazdei pentru a interveni asupra creșterii tumorale. În prezent, imunoterapia cancerului explorează diferite mecanisme de valorificare a ambelor componente, umorală și celulară, ale sistemului imunitar.

Elemente specifice ale răspunsului imunitar celular sunt capabile de a recunoaște și distruge în mod specific celulele tumorale. Izolarea celulelor T din populațiile celulare care infiltrează tumorile sau din sângele periferic sugerează că aceste celule au un rol important în reacția imunitară naturală împotriva cancerului. În special celulele T CD8- pozitive capabile să recunoască moleculele de clasă I ale peptidelor purtătoare ale complexului major de histocompatibilitate (MHC), care includ, de obicei, 8 până la 10 resturi de aminoacizi derivate din proteine sau produse ribozomale defectuoase (DRIP) localizați în citozol, joacă un rol important în acest răspuns. Moleculele MHC umane sunt desemnate și ca antigeni leucocitari umani (HLA).

După cum sunt folosiți aici, și cu excepția cazurilor în care este altfel specificat, toți termenii sunt definiți după cum urmează:

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

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

Mai mult, termenul „peptidă” va include săruri ale unei serii de resturi aminoacid conectate între ele, de obicei, prin punți peptidice între grupările alfa-amino și carbonil ale aminoacizilor adiacenți. De preferință, sărurile sunt săruri acceptabile din punct de vedere farmaceutic ale

peptidelor, cum ar fi, de exemplu, sărurile de clorură sau acetat (trifluoroacetat). Trebuie menționat că sărurile peptidelor în conformitate cu prezenta descoperire diferă în mod substanțial de peptidele în starea lor *in vivo*, întrucât peptidele nu sunt săruri *in vivo*.

5 Termenul „peptidă” include, de asemenea, „oligopeptidă”. Termenul „oligopeptidă” este folosit în prezentul document pentru a desemna o serie de resturi aminoacid conectate între ele de obicei prin punți peptidice între grupările alfa-amino și carbonil ale aminoacizilor adiacenți. Lungimea oligopeptidei nu este critică pentru invenție atât timp cât epitopul corect (sau epitopii corecți) se includ în aceasta. Oligopeptidele au, de obicei, o lungime mai mică de 30 de aminoacizi, dar mai mare de 15 aminoacizi.

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

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

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

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

30 Tabelul 3: Frecvențele de exprimare F pentru HLA\*A02 și HLA-A\*24 și cele mai frecvente serotipuri HLA-DR. Frecvențele sunt deduse din frecvențele haplotipurilor Gf din populația americană adaptate din Mori et al. (Mori et al., 1997) folosind formula Hardy-Weinberg:  $F = 1 - (1 - Gf)^2$ . Combinațiile de A\*02 sau A\*24 cu anumite alele HLA-DR pot fi îmbogățite sau mai puțin frecvente decât s-a estimat pe baza frecvențelor singulare datorită unor dezechilibre de legare. Pentru detalii, vezi Chanock et al. (Chanock et al., 2004).

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

Alelă	Populație	Fenotip calculat din frecvența alelei
DR3	Afro-(nord)-americană	24,80%
DR4	Afro-(nord)-americană	11,10%
DR5	Afro-(nord)-americană	31,10%
DR6	Afro-(nord)-americană	33,70%
DR7	Afro-(nord)-americană	19,20%
DR8	Afro-(nord)-americană	12,10%
DR9	Afro-(nord)-americană	5,80%
DR1	Afro-(nord)-americană	6,80%
DR2	Afro-(nord)-americană	33,80%
DR3	Afro-(nord)-americană	9,20%
DR4	Afro-(nord)-americană	28,60%
DR5	Afro-(nord)-americană	30,00%
DR6	Afro-(nord)-americană	25,10%
DR7	Afro-(nord)-americană	13,40%
DR8	Afro-(nord)-americană	12,70%
DR9	Afro-(nord)-americană	18,60%
DR1	Latino-(nord)-americană	15,30%
DR2	Latino-(nord)-americană	21,20%
DR3	Latino-(nord)-americană	15,20%
DR4	Latino-(nord)-americană	36,80%
DR5	Latino-(nord)-americană	20,00%
DR6	Latino-(nord)-americană	31,10%
DR7	Latino-(nord)-americană	20,20%
DR8	Latino-(nord)-americană	18,60%
DR9	Latino-(nord)-americană	2,10%
A*24	Filipine	65%
A*24	Neneția, Rusia	61%
A*24:02	Japonia	59%
A*24	Malaysia	58%
A*24:02	Filipine	54%
A*24	India	47%
A*24	Coreea de Sud	40%
A*24	Sri Lanka	37%
A*24	China	32%
A*24:02	India	29%
A*24	Australia de Vest	22%
A*24	SUA	22%
A*24	Samara, Rusia	20%
A*24	America de Sud	20%
A*24	Europa	18%

Peptidele din descoperire, de preferință atunci când sunt incluse într-un vaccin al descoperirii, așa cum este descris aici, se leagă de A\*02. Un vaccin poate include, de asemenea,

peptide MHC de clasă II. Prin urmare, vaccinul din descoperire poate fi utilizat pentru tratarea cancerului la pacienți care sunt A\*02 pozitivi, întrucât nu este necesară nicio selecție pentru alotipurile MHC de clasă II având în vedere natura de pan-legare a acestor peptide.

5 Dacă peptidele A\*02 din descoperire sunt combinate cu peptide care se leagă la o altă alelă, de exemplu A\*24, un procent mai mare din orice populație de pacienți poate fi tratat comparativ cu abordarea oricărei alele de MHC de clasă I singulare. În timp ce în majoritatea populațiilor, mai puțin de 50% dintre pacienți pot fi abordați printr-o alelă singulară, un vaccin care conține epitopi de HLA-A\*24 și HLA-A\*02 poate trata cel puțin 60% dintre pacienți din orice populație relevantă. În mod  
10 specific, următoarele procentaje de pacienți vor fi pozitive pentru cel puțin una dintre aceste alele în diferite regiuni: SUA 61%, Europa de Vest 62%, China 75%, Coreea de Sud 77%, Japonia 86% (calculare de pe [www.allelefreqencies.net](http://www.allelefreqencies.net)).

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

15 Secvența nucleotidică ce codifică o anumită peptidă, oligopeptidă sau polipeptidă poate fi întâlnită în mod natural sau poate fi construită artificial. În general, segmentele ADN care codifică peptidele, polipeptidele și proteinele care fac subiectul acestei descoperiri sunt asamblate pornind de la fragmente ADNc și liganzi scurți oligonucleotidici sau de la serii de oligonucleotide, care asigură o genă sintetică capabilă de a fi exprimată într-o unitate de transcriere recombinantă care conține elemente reglatoare derivate dintr-un operon microbial sau viral.

20 Așa cum se utilizează aici, termenul „o codificare (sau codare) cu nucleotide pentru o peptidă” se referă la o codificare cu o secvență de nucleotide pentru peptidă care include coduri de start și stop artificiale (făcute de om) compatibile pentru sistemul biologic pentru care secvența urmează să fie exprimată, de exemplu, o celulă dendritică sau un alt sistem celular util pentru producerea de TCR.

25 Așa cum este utilizată aici, referirea la o secvență de acid nucleic include atât acid nucleic monocatenar, cât și acid nucleic dublu-catenar. Astfel, de exemplu pentru ADN, secvența specifică, dacă contextul nu indică altminteri, se referă la ADN-ul monocatenar al secvenței respective, la duplexul respectivei secvențe cu complementul acesteia (ADN dublu catenar) și la complementul secvenței respective.

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

35 Regiunea de codificare poate fi derivată dintr-o genă non-mutantă („normală”), mutantă sau alterată ori poate fi derivată chiar dintr-o secvență ADN sau o genă sintetizată în întregime în laborator folosindu-se metode bine cunoscute profesioniștilor din domeniul sintezelor ADN.

Termenul „produs de exprimare” se referă la polipeptida sau proteina care reprezintă produsul natural de translație al genei și orice echivalenți de codificare a secvenței de acid nucleic rezultați din degenerarea codului genetic care, astfel, codifică aceiași aminoacizi.

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

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

Termenul „amorsă” se referă la o secvență de acid nucleic scurtă care poate fi cuplată cu o monocatenă de ADN și care asigură un capăt 3'-OH liber la nivelul căruia ADN polimeraza începe sinteza unei catene dezoxiribonucleotidice.

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

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

dintr-un compus, dar rămânând izolate deoarece vectorul sau compusul nu face parte din mediul natural.

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

Produsele de exprimare a acizilor nucleici și polipeptidelor descrise în conformitate cu prezenta descoperire, precum și vectorii de exprimare care conțin acești acizi nucleici și/sau aceste polipeptide pot fi în „formă îmbogățită”. În accepțiunea documentului, termenul „îmbogățit” se referă la faptul că materialul respectiv este în concentrație de cel puțin 2, 5, 10, 100 sau 1000 de ori mai mare decât concentrația sa naturală (de exemplu), mai avantajos 0,01% masic, preferabil cel puțin 0,1% masic. Produsele îmbogățite cu 0,5%, 1%, 5%, 10% și 20% masic sunt de asemenea de interes. Secvențele, compușii, vectorii, clonele și celelalte materiale care sunt cuprinse în prezenta descoperire pot fi, în funcție de interes, în formă îmbogățită sau izolată. Termenul „fragment activ” se referă la un fragment, de obicei o peptidă, o polipeptidă sau o secvență de acid nucleic, care generează un răspuns imunitar (adică, are activitate imunogenă) la administrare, singur sau, opțional, alături de un adjuvant adecvat, unui animal, cum ar fi de exemplu un mamifer, ca de exemplu un iepure sau cobai, dar care include și un om, răspunsul imunitar putând lua forma unui răspuns de stimulare a celulelor T în cadrul animalului primitor, cum ar fi omul. Alternativ, termenul „fragment activ” se poate utiliza pentru inducerea unui răspuns celular T *in vitro*.

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

În accepțiunea prezentului brevet, termenul de „identitate procentuală” sau „procentaj identic”, cu referire la o secvență, presupune că o secvență este comparată cu o secvență patentată sau descrisă după alinierea secvenței care se compară („secvența comparată”) cu secvența descrisă sau patentată („secvență de referință”). Identitatea procentuală se determină conform următoarei formule: identitate procentuală =  $100 [1 - (C/R)]$

unde C este numărul de diferențe dintre secvența de referință și secvența comparată pe lungimea aliniamentului dintre secvența de referință și cea comparată, în care

(i) fiecare bază sau aminoacid din secvența de referință care nu are un corespondent aliniat, bază sau aminoacid, în secvența comparată și

(ii) fiecare lipsă din secvența de referință și

(iii) fiecare bază sau aminoacid aliniat(ă) din secvența de referință care diferă de baza sau aminoacidul aliniat din secvența comparată, reprezintă diferențe;

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

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

Dacă există un aliniament între secvența comparată și secvența de referință pentru care identitatea procentuală calculată anterior este aproximativ egală cu, sau mai mare decât o identitate procentuală minimă specificată, atunci secvența comparată are o identitate procentuală minimă specificată cu secvența de referință, deși pot exista aliniamente pentru care anterior-menționata identitate procentuală să fie mai mică decât identitatea procentuală specificată.

După cum s-a menționat mai sus, prezenta descoperire furnizează, astfel, o peptidă care cuprinde o secvență care este selectată din grupul format din SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 191 sau o variantă a acesteia care este 88% omologă SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 191, sau o variantă a acesteia care va induce reactivitate încrucișată a celulelor T cu peptida menționată. Peptidele din descoperire au capacitatea de a se lega de o moleculă a complexului major de

histocompatibilitate (MHC) uman de clasă I sau de versiuni alungite ale peptidelor menționate la clasa II.

În prezenta descoperire, termenul „omolog” se referă la gradul de identitate (consultați secțiunea „Identitate procentuală” de mai sus) dintre secvențele a două secvențe de aminoacizi, adică secvențe peptidice sau polipeptidice. Anterior menționata „omologie” se stabilește prin compararea a două secvențe aliniate în condiții optime cu secvențele care vor trebui comparate. O astfel de omologie a secvenței se poate calcula prin crearea unei alinieri folosind, de exemplu, algoritmul ClustalW. Programe de analiză a secvenței disponibile în mod obișnuit, mai specific Vector NTI, GENETYX sau alte instrumente sunt furnizate de baze de date publice.

Specialiștii în domeniu vor putea analiza dacă celulele T induse de o variantă a unei peptide specifice vor putea reacționa încrucișat cu peptida în sine (Appay et al., 2006; Colombetti et al., 2006; Fong et al., 2001; Zaremba et al., 1997).

Prin „variantă” a unei secvențe date de aminoacizi, inventatorii se referă la faptul că lanțurile secundare provenite, de exemplu, de la unul sau două resturi de aminoacid sunt modificate (de exemplu prin substituirea lor cu lanțul secundar al altui rest de aminoacid natural sau cu un alt lanț secundar) astfel încât peptida să fie în continuare capabilă să se lege de molecula HLA în principal în același mod ca și peptida care conține secvența dată de aminoacid constând din SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 191. De exemplu, o peptidă se poate modifica astfel încât aceasta să mențină, dacă nu să îmbunătățească abilitatea de a interacționa cu și de a se lega de un situs de legare al unei molecule MHC adecvate, cum ar fi HLA-A\*02 sau –DR, și astfel să mențină - cel puțin, dacă nu să

îmbunătățească abilitatea de a se lega la TCR pentru celulele T activate. Aceste celule T pot apoi reacționa încrucișat cu celulele și pot distruge celulele care exprimă o polipeptidă care conține secvența naturală de aminoacizi a peptidei înrudite definite în descrierea descoperirii. După cum se poate deriva din literatura de specialitate și baze de date (Rammensee et al., 1999; Godkin et al., 1997), anumite poziții ale peptidelor care leagă HLA sunt de obicei reziduuri ancoră care constituie o secvență centrală care corespunde tiparului de cuplare al incizurii de cuplare a receptorului HLA, care este definit de proprietățile polare, electrofizice, hidrofobe și spațiale ale lanțului polipeptidei care constituie incizura de cuplare. Astfel, un expert în domeniu ar putea modifica secvențele de aminoacizi stabilite în SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 191, prin menținerea resturilor-ancoră, și vor putea stabili dacă aceste variante își mențin abilitatea de a se lega de moleculele MHC de clasă I sau II. Variantele prezentei descoperiri își păstrează abilitatea de a lega TCR pentru celule T activate, care pot reacționa încrucișat cu celulele și pot ucide celulele care exprimă polipeptida care conține secvența naturală de aminoacid a peptidei înrudite definite în descrierea invenției.

Peptidele originale (nemodificate) în conformitate cu descrierea din prezentul document se pot modifica prin substituirea unuia sau a mai multor resturi din diferite poziții diferite, posibil selectate, din structura catenei peptidice, dacă nu s-a specificat altfel. Preferabil, aceste substituții sunt localizate la capătul catenei de aminoacizi. Astfel de substituții pot fi conservatoare, de exemplu, dacă un aminoacid este substituit cu un alt aminoacid cu structură și caracteristici similare, astfel încât de exemplu un aminoacid hidrofob să fie înlocuit cu un alt aminoacid hidrofob. Mult mai conservatoare ar fi înlocuirea aminoacizilor cu unii de dimensiune și natură chimică identică sau similară, cum ar fi în cazul în care leucina este înlocuită de izoleucină. În studiile variațiilor de secvențe la familii cu proteine omologe natural-survenite, anumite substituții aminoacide sunt mai frecvent tolerate decât altele, aceasta corelandu-se cu similitudinile de dimensiune, sarcină, polaritate și hidrofobitate dintre aminoacidul natural și cel care îl înlocuiește, aceasta fiind baza de definire a „substituțiilor conservatoare”.

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

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

Desigur, aceste substituții pot implica structuri diferite de L-aminoacizii uzuali. Astfel, D-aminoacizii se pot substitui cu L-aminoacizii identificați uzual în peptidele antigenice ale descoperirii, fiind în continuare incluși în prezentul document. În plus, aminoacizii nestandard (adică alții decât

aminoacizii proteinogeni care se găsesc în mod natural) pot fi utilizați și în scopuri de substituție pentru a produce imunogeni și polipeptide imunogene în conformitate cu prezenta descoperire.

Dacă substituțiile din mai mult de o poziție se descoperă că pot conduce la o peptidă cu activitate antigenică substanțial echivalentă sau mai mare decât cea descrisă mai jos, atunci aceste substituții se vor testa pentru a identifica dacă substituțiile combinate provoacă efecte cumulative sau sinergice ale antigenicității peptidei. În cel mai rău caz, nu se pot substitui simultan mai mult de 4 poziții din cadrul peptidei.

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

Reziduurile aminoacidice care nu contribuie substanțial la interacțiunea cu receptorul celulelor T pot fi modificate prin substituirea cu alți aminoacizi a căror încorporare nu modifică substanțial reactivitatea celulelor T și care nu elimină cuplarea cu MHC relevant. Astfel, cu excepția condiției explicate, peptida care face obiectul descoperirii poate fi orice peptidă (termen în care includem și oligopeptide sau polipeptide) care include secvențele de aminoacizi sau o porțiune sau variantă a acestora.

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

Peptidele din descoperire pot fi alungite cu până la patru aminoacizi, adică 1, 2, 3 sau 4 aminoacizi pot fi adăugați la orice capăt în orice combinație între 4:0 și 0:4. Combinațiile alungirilor conform descoperirii pot fi găsite în Tabelul 4.

Tabelul 4: Combinații de alungiri ale peptidelor conform invenției

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

Aminoacizii pentru alungire/extindere pot fi peptidele secvenței inițiale a proteinei sau a oricărui alt aminoacid S. Alungirea poate fi utilizată pentru a spori stabilitatea sau solubilitatea peptidelor.

Astfel, epitopii din prezenta descoperire pot fi identici cu cei care apar natural asociați tumorii sau specificei tumorii, sau pot include epitopi care diferă prin cel mult patru resturi de peptida de referință, atâta timp cât au activitate antigenică substanțial identică.

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

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

Desigur, peptida sau varianta în conformitate cu prezenta descoperire va avea capacitatea să se lege de o moleculă a complexului major de histocompatibilitate (MHC) uman de clasă I or II. Legarea unei peptide sau a unei variante la un complex MHC poate fi testată prin metode cunoscute în domeniu.

5 De preferat, atunci când celulele T specifice pentru o peptidă în conformitate cu prezenta descoperire sunt testate față de peptide substitute, concentrația de peptide la care peptidele substituite ating jumătate din creșterea maximă a lizei comparativ cu fundalul este mai mică de 1mM, preferabil nu depășește 1 μM, și mai preferabil nu depășește 1nM, – cel mai preferabil nu depășește 100 pM și în mod ideal nu depășește 10 pM. Este, de asemenea, de preferat ca peptida substituită să fie recunoscută

10 de celule T provenind de la mai mulți indivizi, preferabil doi, dar, și mai preferabil, trei indivizi. Intra-o realizare preferată în mod special a descoperirii, peptida constă sau constă în esență dintr-o secvență de aminoacizi conformă cu SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 191.

15 „Constand în esență din” înseamnă că o peptidă în conformitate cu prezenta descoperire, pe lângă secvența în conformitate cu oricare dintre SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 191 sau o variantă a acestora, conține segmente de aminoacid N-terminale sau C-terminale care nu fac în mod necesar parte din peptida care funcționează ca epitop pentru molecule MHC.

20 Totuși, aceste resturi pot fi importante pentru a furniza o introducere adecvată a peptidei care face obiectul prezentei descoperiri în interiorul celulei. Intra-o realizare a prezentei invenției, peptida face parte dintr-o proteină de fuziune care conține, de exemplu, cei 80 aminoacizi N-terminali ai lanțului invariabil asociat antigenului HLA-DR (p33, următoarea „Ii”) derivați din NCBI, număr de identificare GenBank X00497. În alte fuziuni, peptidele din prezenta descoperire pot fi fuzionate la un anticorp așa cum este descris în prezentul document, sau o parte funcțională a acestuia, în special într-o secvență a unui anticorp, astfel încât să fie direcționate în mod specific de respectivul anticorp, sau, de exemplu, către sau într-un anticorp care este specific pentru celulele dendritice descrise în

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

30 Intra-o legătură peptidică inversată, reziduurile aminoacidice nu sunt unite prin legături peptidice (-CO-NH-), ci legătura peptidică este inversată. Astfel de retro-inverso peptido-mimetice se pot obține utilizând metodele cunoscute în literatura de specialitate, cum ar fi de exemplu cele descrise în Meziere et al. (1997) (Meziere et al., 1997), incorporate în prezentul document prin referință. Această abordare implică sinteza de pseudopeptide care conțin modificări care implică scheletul și nu orientarea lanțurilor secundare. Meziere et al. (Meziere et al., 1997) arată că aceste pseudopeptide

35 sunt utile pentru legarea MHC și răspunsurile celulelor T helper. Peptidele retro-inversate, care conțin legături NH-CO și nu legături peptidice CO-NH, sunt mult mai rezistente la proteoliză. O legătură non-peptidică este, de exemplu, -CH<sub>2</sub>-NH, -CH<sub>2</sub>S-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH=CH-, -COCH<sub>2</sub>-, -CH(OH)CH<sub>2</sub>-, și -CH<sub>2</sub>SO-. US 4,897,445 furnizează o metodă pentru sinteza în fază solidă a unor legături non-peptidice (-CH<sub>2</sub>-NH) în lanțuri de polipeptide care implică polipeptide sintetizate de procedurile standard și legături non-peptidice sintetizate prin reacția dintre o amino-aldehidă și un aminoacid în prezența NaCNBH<sub>3</sub>.

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

50 pot fi adăugate capătului peptidic amino-terminal. Mai mult, peptidele din descoperire pot fi sintetizate în funcție de configurația lor sterică. De exemplu, se poate utiliza izomerul D al unuia sau mai multor resturi de aminoacid peptidic în locul izomerului L uzual. Ba chiar mai mult, cel puțin unul dintre resturile de aminoacid al peptidei din descoperire poate fi substituit cu unul dintre resturile de aminoacid cunoscute, care nu apar în mod natural. Alterări de tipul acestora pot ajuta la creșterea stabilității, biodisponibilității și/sau legării

55 peptidelor care fac obiectul descoperirii. Similar, o peptidă sau o variantă a descoperirii se poate modifica din punct de vedere chimic prin reacții cu diverși aminoacizi înainte sau după sinteza peptidei. Exemplele acestor modificări sunt bine cunoscute în domeniu și sunt rezumate, de exemplu, în R. Lundblad, Chemical Reagents for Protein Modification, 3rd ed. CRC Press, 2004 (Lundblad, 2004), incorporate aici prin referință. Modificarea chimică a aminoacizilor include, fără a se limita la, modificarea prin acilare, amidinare, piridoxilarea lizinei, alkilare reductivă, trinitrobenzilarea grupurilor amino cu acid 2,4,6-trinitrobenzen

sulfonic (TNBS), modificarea amidică a grupărilor carboxil și sulfhidril prin oxidarea cu acid performic a cisteinei la acid cisteic, formarea de derivați de mercur, formarea de disulfide mixte cu alți compuși tiolici, reacția cu maleimidă, carboximetilarea cu acid iodoacetic sau iodoacetamidă și carbamoilare cu cianat la pH alcalin, deși fără a se limita la acestea. În aceste privințe, doritorii sunt trimiși la Capitolul 15 al protocolului prezent din Protein Science, Eds. Coligan et al. (John Wiley and Sons NY 1995-2000) (Coligan et al., 1995) pentru metodologia extinsă legată de modificarea chimică a proteinelor.

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

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

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

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

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

O peptidă sau o variantă, în care peptida este modificată sau include legături non-peptidice reprezintă un exemplu preferat al descoperirii. În general, peptidele și variantele (cel puțin cele care conțin legături peptidice între resturile aminoacidice) pot fi sintetizate prin modul Fmoc-poliamidă al sintezei peptidelor în stare solidă, după cum se arată în Lu et al. (Lukas et al., 1981) și referințele citate în prezentul document. Protecția temporară a grupării N-amino este asigurată de gruparea 9-fluorenilmetiloxicarbonil (Fmoc). Clivajul repetitiv al acestei grupări de protecție cu intensă labilitate de bază este realizat folosind 20% piperidină în N,N-dimetilformamidă. Funcționalitățile lanțurilor secundare se pot proteja sub forma butil-eterilor (în cazul serinei, treoninei și tirozinei), a butil-esterilor (în cazul acizilor glutamic și aspartic), a derivaților butiloxicarbonil (în cazul lizinei și histidinei), a derivaților tritol (în cazul cisteinei) și a derivaților de 4-metoxi-2,3,6-trimetilbenzensulfonil (în cazul argininei). Dacă resturile C-terminale sunt glutamina sau asparagina, pentru protejarea funcției amido a lanțului secundar se va folosi gruparea 4,4'-dimetoxibenzhidril. Suportul în faza solidă este furnizat de un polimer polidimetil-acrilamidă format din cei trei monomeri dimetilacrilamidă (schelet-monomer), bisacriloletilen diamină (agent de legătură) și acrilolsarcozinmetil-ester (agent de funcționalizare). Agentul de legătură peptidă-rășină scindabil folosit este derivatul labil în mediu acid al acidului 4-hidroxi-metil-fenoxiacetic. Toți derivații aminoacid sunt adăugați sub formă de derivați simetrici anhidri preformați cu excepția asparaginei și glutaminei, care sunt adăugate folosind o procedură de cuplare inversă mediată de N,N-diciclohexil-carbodiimidă/1-hidroxibenzotriazol. Toate reacțiile de cuplare și deprotezare sunt monitorizate folosind proceduri care folosesc ninhidrină, trinitrobenzen, acid sulfonic și izotină-test. După finalizarea sintezei, peptidele sunt scindate din suportul rezinic cu îndepărtarea concomitentă a grupărilor protectoare ale lanțurilor secundare prin tratarea cu acid trifluoroacetic 95% care conține un amestec curățător 50%. Substanțele de curățare folosite cel mai frecvent includ etan-ditiol, fenol, anisol și apă, alegerea exactă fiind dependentă de aminoacizii constituenți ai peptidei sintetizate. De asemenea, pentru sintetizarea peptidelor, se poate utiliza o combinație de metode în stare solidă și în stare de soluție (vezi, de exemplu, (Bruckdorfer et al., 2004) și referințele citate în prezentul document).

Acidul trifluoroacetic este îndepărtat prin evaporare *in vacuo*, cu triturarea ulterioară cu dietileter, care duce la formarea peptidei brute. Toate substanțele de curățare prezente sunt eliminate printr-o procedură simplă de extragere, care, după liofilizare în fază apoasă, conduce la peptida brută fără substanțe de curățare. Reactivii pentru sinteza peptidelor sunt în general disponibili, de exemplu,

de la Calbiochem-Novabiochem (Nottingham, Regatul Unit).

Purificarea poate fi realizată prin una sau mai multe tehnici, precum recristalizarea, cromatografia cu excludere dimensională, cromatografia cu schimb de ioni, cromatografia cu interacțiune hidrofobă și (de regulă) cromatografia lichidă de înaltă performanță în fază inversă, folosind, de exemplu, separare în gradient de acetoneitril/apă.

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

Pentru a selecta peptide supraprezentate, se calculează un profil de prezentare arătând prezentarea mediană a probei, precum și variația replicării. Profilul juxtapune probe ale entității tumorale de interes pentru o linie de bază a probelor de țesut normal. Fiecare dintre aceste profile poate fi apoi consolidat într-un scor de supraprezentare, calculându-se valoarea  $p$  a unui model liniar cu efecte combinate (Pinheiro et al., 2015), care se ajustează pentru testarea multiplă prin rata de descoperire falsă (Benjamini and Hochberg, 1995).

Pentru identificarea și cuantificarea relativă a liganzilor HLA prin spectrometrie de masă, moleculele HLA din probele de țesut înghețat prin șoc au fost purificate și peptidele asociate cu HLA au fost izolate. Peptidele izolate au fost separate și secvențele au fost identificate prin experimente online de nano-electropulverizare-ionizare (nanoESI) prin cromatografie de lichid-spectrometrie de masă (LC-MS). Secvențele peptidice rezultate au fost verificate prin compararea modelului de fragmentare a peptidelor asociate TUMAP-urilor naturale înregistrate din probe de CRC (N = 24 probe A\*02-pozitive) cu modele de fragmentare ale peptidelor de referință sintetice corespunzătoare ale secvențelor identice. Deoarece peptidele au fost identificate direct ca liganzi ai moleculelor HLA ale tumorilor primare, aceste rezultate furnizează dovezi directe pentru procesarea și prezentarea naturală ale peptidelor identificate pe țesutul canceros primar obținut de la 24 de pacienți cu CRC.

Pipeline-ul descoperirii XPRESIDENT® v2.1 (vezi, de exemplu, US 2013-0096016, care este încorporat în mod specific aici prin referință în întregime) permite identificarea și selectarea candidaților relevanți pentru vaccinare cu peptide supraprezentate pe baza cuantificării relative directe a nivelurilor de peptide HLA-restricționate pe țesuturile canceroase comparativ cu mai multe țesuturi și organe necanceroase diferite. Acest lucru a fost realizat prin dezvoltarea unei cuantificări diferențiale fără etichete utilizându-se datele LC-MS obținute, procesate de un pipeline patentat de analiză a datelor, combinându-se algoritmi pentru identificarea secvențelor, gruparea spectrală, numărarea ionilor, alinierea timpului de retenție, deconvoluția de stare a încărcării și normalizarea.

Au fost stabilite nivelurile de prezentare, inclusiv estimările de eroare pentru fiecare peptidă și probă. Au fost identificate peptide prezentate exclusiv pe țesuturi tumorale și peptide supraprezentate în tumoră față de țesuturi și organe necanceroase.

Complecșii HLA-peptidă din probe de țesut de CRC au fost purificate și peptidele HLA-asociate au fost izolate și analizate prin LC-MS (vezi exemplele). Toate peptidele TUMAP conținute în prezenta aplicație au fost identificate cu această abordare pe probe de CRC primar, confirmându-se prezentarea acestora pe CRC primar.

TUMAP-urile identificate pe mai multe de CRC și țesuturi normale au fost cuantificate utilizându-se numărarea de ioni la datelor LC-MS fără etichete. Metoda presupune că zonele de semnal LC-MS ale unei peptide se corelează cu abundența sa în probă. Toate semnalele cantitative ale unei peptide în diferite experimente LC-MS au fost normalizate pe baza tendinței centrale, mediate per probă și fuzionate într-o diagramă de bare, denumită profil de prezentare. Profilul de prezentare consolidează diferite metode de analiză, cum ar fi căutarea în baza de date cu proteine, gruparea spectrală, deconvoluția de stare de încărcare (decompresie) și alinierea și normalizarea timpului de retenție.

Mai mult, pipeline-ul descoperirii XPRESIDENT® v2.x permite cuantificarea absolută directă a nivelurilor de peptide MHC-restricționate, de preferință HLA-restricționate, pe țesuturi de cancer sau alte țesuturi infectate. Pe scurt, numărul total de celule a fost calculat din conținutul total de ADN al probei de țesut analizate. Cantitatea totală de peptidă pentru un TUMAP într-o probă de țesut a fost măsurată prin nanoLC-MS/MS ca raport între TUMAP-ul natural și o cantitate cunoscută dintr-o versiune marcată cu izotop de TUMAP, așa-numitul standard intern. Eficacitatea izolării TUMAP-urilor a fost determinată prin îmbogățirea complexelor peptidă:MHC ale tuturor TUMAP-urilor selectate în lizatul de țesut în cel mai timpuriu punct posibil al procedurii de izolare a TUMAP-urilor

și detectarea lor prin nanoLC-MS/MS după finalizarea procedurii de izolare a peptidei. Numărul total de celule și cantitatea de peptidă totală au fost calculate din măsurători triplicate pentru fiecare probă de țesut. Eficiențele izolării specifice peptidei au fost calculate ca medie din 10 experimente cu îmbogățire, măsurate fiecare ca triplicat (vezi Exemplul 6 și Tabelul 9).

5 Prezența descoperire furnizează peptide care sunt utile în tratarea cancerelor/tumorilor, de preferință CRC, care supraprezintă sau prezintă exclusiv peptidele din descoperire. Aceste peptide sunt ilustrate prin spectrometrie de masă pentru a fi prezentate în mod natural de către moleculele HLA pe probe primare umane de CRC.

10 S-a constatat că genele-/proteinele-sursă (denumite și „proteine de lungime completă” sau „proteine subiacente”), din care sunt derivate peptidele, sunt foarte supraexprimate în cancer comparativ cu țesuturile normale – „țesuturi normale”, în raport cu această descoperire, înseamnă fie celule sănătoase din intestinul gros (colon sau rect), fie alte celule tisulare normale, care demonstrează un grad ridicat de asociere tumorală a genelor-sursă (vezi Exemplul 2). Mai mult, peptidele în sine sunt puternic supraprezentate pe țesutul tumoral – „țesut tumoral”, în raport cu această descoperire, înseamnă o probă de la un pacient care suferă de CRC, însă nu și pe țesuturi normale (a se vedea Exemplul 1).

Peptidele legate de HLA se pot recunoaște de către sistemul imunitar, în special de limfocite T. Celulele T pot distruge celulele care prezintă complexul HLA-peptidă recunoscut, de exemplu celulele CRC care prezintă peptidele derivate.

20 Peptidele din prezența descoperire s-au dovedit a fi capabile să stimuleze răspunsurile celulelor T și/sau sunt supraprezentate și astfel pot fi utilizate pentru producerea de anticorpi și/sau TCR-uri, cum ar fi sTCR-uri solubile, conform prezenței descoperiri (vezi Exemplul 3 și Exemplul 4). Mai mult, complexul format de peptide cu MHC-ul respectiv poate fi folosit și pentru producția de anticorpi specifici și/sau TCR-uri, în particular sTCR-uri, în conformitate cu prezența descoperire. 25 Metodele respective sunt bine cunoscute de experții în domeniu și pot fi găsite și în literatura de specialitate respectivă. Astfel, peptidele din prezența descoperire sunt utile pentru generarea unui răspuns imunitar la un pacient, prin care celulele tumorale pot fi distruse. Răspunsul imun la pacient poate fi indus prin administrarea directă a peptidelor descrise sau a substanțelor precursore adecvate (de exemplu peptide elongate, proteine sau acizi nucleici care codifică aceste peptide) la pacient, în mod ideal combinate cu un agent care crește imunogenitatea (de exemplu un adjuvant). Răspunsul imunitar care are originea în astfel de vaccinare terapeutică se poate aștepta să fie foarte specific împotriva celulelor tumorale deoarece peptidele țintă ale prezenței descoperiri nu sunt prezente pe țesuturi normale în numere de copii comparabile, fapt care previne riscul unor reacții autoimune nedorite îndreptat împotriva celulelor normale ale pacientului.

35 Prezența descoperire se referă și la receptori de celule T (TCR-uri) care cuprind un lanț alfa și un lanț beta („TCR-uri alfa/beta”). De asemenea, sunt furnizate peptide capabile să se lege la TCR-uri și anticorpi atunci când sunt prezentate de o moleculă MHC. Prezența descoperire se referă, de asemenea, la acizi nucleici, vectori și celule-gazdă pentru exprimarea TCR-urilor și peptidelor din prezența descoperire, precum și la metodele de utilizare ale acestora.

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

45 Intr-una dintre concretizări, descoperirea oferă o metodă de producere a unui TCR așa cum este descris aici, metoda cuprinzând cultivarea unei celule-gazdă capabile să exprime TCR-ul în condiții adecvate pentru promovarea exprimării TCR.

50 Descrierea într-un alt aspect se referă la metode în conformitate cu descoperirea în care antigenul este încărcat pe molecule de MHC de clasă I sau de clasă II exprimate pe suprafața unei celule prezentatoare de antigen adecvate sau a unei celule prezentatoare de antigen artificiale prin punerea în contact a unei cantități suficiente de antigen cu o celulă prezentatoare de antigen sau antigenul este încărcat pe tetrameri MHC de clasă I sau II prin tetramerizarea monomerilor complexului antigen/MHC de clasă I sau II.

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

60 În ceea ce privește TCR-urile gamma/delta, termenul „domeniu variabil TCR gamma”, așa cum este utilizat aici, se referă la concatenarea regiunii TCR gamma V (TRGV) fără regiunea lider (L)

și a regiunii TCR gamma J (TRGJ), iar termenul „domeniu constant TCR gamma” se referă la regiunea TRGC extracelulară sau la o secvență TRGC trunchiată C-terminal. În mod similar, termenul „domeniu variabil TCR delta” se referă la concatenarea regiunii TCR delta V (TRDV) fără regiunea lider (L) și a regiunii TCR delta D/J (TRDD/TRDJ), iar termenul „domeniu constant TCR delta” se referă la regiunea TRDC extracelulară sau la o secvență TRDC trunchiată C-terminal.

TCR-urile din prezenta descoperire se leagă de preferință la un complex de molecule peptidice-HLA cu o afinitate de legare (KD) de aproximativ 100  $\mu$ M sau mai puțin, de aproximativ 50  $\mu$ M sau mai puțin, de aproximativ 25  $\mu$ M sau mai puțin sau de aproximativ 10  $\mu$ M sau mai puțin. Mai preferate sunt TCR-urile cu afinitate ridicată care au afinități de legare de aproximativ 1  $\mu$ M sau mai puțin, de aproximativ 100 nM sau mai puțin, de aproximativ 50 nM sau mai puțin, de aproximativ 25 nM sau mai puțin. Exemple nelimitatoare de afinitate de legare preferate pentru TCR-urile prezentei descoperiri includ: de la aproximativ 1 nM până la aproximativ 10 nM; de la aproximativ 10 nM până la aproximativ 20 nM; de la aproximativ 20 nM până la aproximativ 30 nM; de la aproximativ 30 nM până la aproximativ 40 nM; de la aproximativ 40 nM până la aproximativ 50 nM; de la aproximativ 50 nM până la aproximativ 60 nM; de la aproximativ 60 nM până la aproximativ 70 nM; de la aproximativ 70 nM până la aproximativ 80 nM; de la aproximativ 80 nM până la aproximativ 90 nM; și de la aproximativ 90 nM până la aproximativ 100 nM.

Așa cum este utilizat aici în legătură cu TCR-urile din prezenta descoperire, „legare specifică” și variante gramaticale ale acestei sintagme sunt utilizate pentru a desemna un TCR care are o afinitate de legare (KD) pentru un complex molecular peptidă-HLA de 100  $\mu$ M sau mai puțin.

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

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

TCR-urile din prezenta descoperire pot cuprinde o etichetă detectabilă aleasă din grupul constând dintr-un radionuclid, un fluorofor și biotină. TCR-urile din prezenta descoperire pot fi conjugate cu un agent activ terapeutic, cum ar fi un radionuclid, un agent chimioterapeutic sau o toxină.

Intr-una dintre concretizări, un TCR din prezenta descoperire care are cel puțin o mutație în lanțul alfa și/sau cel puțin o mutație în lanțul beta a modificat glicozilarea în comparație cu TCR-ul fără mutație.

În altă concretizare, un TCR cuprinzând cel puțin o mutație în lanțul alfa TCR și/sau lanțul beta TCR are o afinitate de legare pentru și/sau o semiviată de legare pentru un complex de molecule peptidă-HLA care este cel puțin dublu față de un TCR cuprinzând lanțul alfa TCR fără mutație și/sau lanțul beta TCR fără mutație. Creșterea afinității TCR-urilor specifice tumorii și exploatarea acestora se bazează pe existența unei ferestre pentru afinități optime ale TCR-urilor. Existența unei astfel de ferestre se bazează pe observații conform cărora TCR-urile specifice pentru agenții patogeni cu HLA-A2-restricționați au valori KD care sunt în general de aproximativ 10 ori mai mici în comparație cu TCR-uri specifice pentru autoantigenii asociați tumorii HLA-A2-restricționate. Este cunoscut acum că, deși antigenii tumorali au potențialul de a fi imunogeni, deoarece tumorile apar din propriile celule ale individului, numai proteinele cu mutație sau proteinele cu procesare translațională modificată vor fi văzute ca străine de către sistemul imunitar. Antigenii care sunt reglați în sens crescător sau supraexpriați (așa-numiții autoantigeni) nu vor induce neapărat un răspuns imun funcțional împotriva tumorii: Celulele T care exprimă TCR-uri foarte reactive la acești antigeni au fost selectate negativ în timus într-un proces cunoscut sub numele de toleranță centrală, ceea ce înseamnă că rămân doar celulele T cu TCR-uri cu afinitate scăzută pentru autoantigeni. Prin urmare, afinitatea TCR-urilor sau a variantelor din prezenta descriere pentru peptidele în conformitate cu descoperirea poate fi îmbunătățită prin metode bine cunoscute în domeniu.

Prezenta descriere se mai referă la o metodă de identificare și de izolare a unui TCR în conformitate cu prezenta descriere, respectiva metodă cuprinzând incubarea de PBMC-uri de la donatori sănătoși HLA-A\*02-negativi cu monomeri peptidici/A2, incubarea PBMC-urilor cu tetramer-ficoeritrină (PE) și izolarea celulelor T cu aviditate ridicată prin analiză cu sortare de celule activată prin (FACS)-Calibur.

Prezenta descriere se mai referă la o metodă de identificare și de izolare a unui TCR în conformitate cu prezenta descriere, respectiva metodă cuprinzând obținerea unui șoarece transgenic cu întregii loci a genei TCR $\alpha$  complet umani (1,1 și 0,7 Mb) ale cărui celule T exprimă un repertoriu divers de TCR-uri umane, repertoriu care compensează deficiența de TCR-uri murine, imunizând șoarecele cu peptida de interes, incubând PBMC-urile obținute de la șoarecii transgenici cu tetramer-fitoceritrină (PE) și izolând celulele T cu aviditate ridicată prin analiză cu sortare de celule activată prin fluorescență (FACS)-Calibur.

Intr-unul dintre aspecte, pentru a obține celule T care exprimă TCR-uri din prezenta descoperire, acizii nucleici care codifică lanțurile TCR-alfa și/sau TCR-beta din prezenta descoperire sunt clonați în vectori de exprimare, de exemplu gamma-retrovirus sau gamma-lentivirus. Virusurile recombinante sunt generate și apoi testate pentru funcționalitate, cum ar fi specificitatea antigenică și aviditatea funcțională. O parte alicotă a produsului final este apoi utilizată pentru a transduce populația de celule T țintă (în general purificată din PBMC-urile pacientului), care este extinsă înainte de perfuzare în pacient. Într-un alt aspect, pentru a obține celule T care exprimă TCR-uri din prezenta descoperire, ARN-urile TCR-urilor sunt sintetizate prin tehnici cunoscute în domeniu, de exemplu, cu sisteme de transcripție *in vitro*. ARN-urile de TCR sintetizate *in vitro* sunt apoi introduse în celulele T CD8 + primare obținute de la donatori sănătoși prin electroporare pentru a reexprima lanțurile TCR-alfa și/sau TCR-beta specifice tumorii.

Pentru a crește exprimarea, acizii nucleici care codifică TCR-urile din prezenta descoperire pot fi legați în mod operațional cu promotori puternici, cum ar fi repetițiile terminale lungi retrovirale (LTR-uri), citomegalovirusul (CMV), virusul celulelor stem murine (MSCV) U3, fosfogliceratul kinazic (PGK),  $\beta$ -actina, ubiquitina și un promotor compus de virus simian 40 (SV40)/CD43, factorul de alungire (EF)-1a și promotorul de virus formator de focar splenic (SFFV). Într-o concretizare preferată, promotorul este heterolog cu acidul nucleic exprimat. În afară de promotori puternici, casetele de exprimare a TCR-urilor din prezenta descoperire pot conține elemente suplimentare care pot îmbunătăți exprimarea transgenică, inclusiv un tract polipurinic central (cPPT), care promovează translocarea nucleară a construcțiilor lentivirale (Follenzi et al., 2000), și elementul de reglare post-transcripțional al virusului hepatitei marmotei (wPRE), care crește nivelul de exprimare transgenică prin creșterea stabilității ARN-ului (Zufferey et al., 1999).

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

Realizarea unei exprimări de suprafață de nivel ridicat a TCR-urilor necesită ca atât lanțurile TCR-alfa, cât și lanțurile TCR-beta ale TCR-urilor introduse să fie transcrise la niveluri ridicate. Pentru a realiza acest lucru, lanțurile TCR-alfa și TCR-beta din prezenta descoperire pot fi clonate în construcții bi-cistronice într-un singur vector, care s-a dovedit a fi capabil să depășească acest obstacol. Utilizarea unui loc viral de intrare intra-ribozomal (IRES) între lanțurile TCR-alfa și TCR-beta are ca rezultat exprimarea coordonată a ambelor lanțuri, deoarece lanțurile TCR-alfa și TCR-beta sunt generate dintr-o singură transcriere care este scindată în două proteine în timpul translației, asigurându-se producerea unui raport molar egal al lanțurilor TCR-alfa și TCR-beta. (Schmitt et al. 2009).

Acizii nucleici care codifică TCR-urile din prezenta descoperire pot fi optimizați cu codoni pentru a crește exprimarea de la o celulă-gazdă. Redundanța în codul genetic permite codificarea unor aminoacizi de către mai mulți codoni, însă anumiți codoni sunt mai puțin „optimi” decât alții din cauza disponibilității relative a ARNt-urilor corespondente, precum și a altor factori (Gustafsson et al., 2004). Modificarea secvențelor de gene TCR-alfa și TCR-beta astfel încât fiecare aminoacid să fie codificat de codonul optim pentru exprimarea genelor de mamifere, precum și eliminarea motivelor de instabilitate a ARNm-ului sau a locurilor de imbinare criptice, s-a dovedit că îmbunătățește semnificativ exprimarea genelor TCR-alfa și TCR-beta (Scholten et al., 2006).

Mai mult, împerecherea greșită între lanțurile de TCR-uri introduse și endogene poate cauza dobândirea de specificități care prezintă un risc semnificativ pentru autoimunitate. De exemplu, formarea de dimeri de TCR-uri mixte poate reduce numărul de molecule CD3 disponibile pentru formarea de complexe TCR împerecheate corespunzător și, prin urmare, poate scădea semnificativ aviditatea funcțională a celulelor care exprimă TCR-ul introdus (Kuball et al., 2007).

Pentru a reduce împerecherea greșită, domeniul C-terminal al lanțurilor TCR introduse din prezenta descoperire poate fi modificat pentru promovarea afinității între lanțuri, reducând totodată capacitatea lanțurilor introduse de a se împerechea cu TCR-ul endogen. Aceste strategii pot include înlocuirea domeniilor TCR-alfa și TCR-beta C-terminale umane cu omologii lor murini (domeniul C-terminal murinizat); generarea unei a doua legături de disulfură între lanțuri în domeniul C-terminal prin introducerea unui al doilea reziduu de cisteină atât în lanțurile TCR-alfa, cât și în lanțurile TCR-beta ale TCR-ului introdus (modificare a cisteinei); schimbarea între ele a reziduurilor care interacționează în domeniile C-terminale ale lanțurilor TCR-alfa și TCR-beta („buton în gaură”); și

fuzionarea domeniilor variabile ale lanțurilor TCR-alfa și TCR-beta direct cu CD3 $\zeta$  (fuziune CD3 $\zeta$ ). (Schmitt et al. 2009).

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

O „compoziție farmaceutică” este compoziție potrivită pentru administrarea la o ființă umană într-un cadru medical. De preferință, o compoziție farmaceutică este sterilă și produsă conform recomandărilor GMP.

Compozițiile farmaceutice conțin peptidele fie în forma liberă fie sub forma unei săruri acceptabile din punct de vedere farmaceutic (a se vedea mai sus). În accepțiunea prezentului document, „sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic” se referă la un derivat al peptidei menționate în care peptida este modificată prin formarea de săruri acide sau bazice ale agentului. De exemplu, sărurile acide sunt produse din baza liberă (de obicei în forma neutră medicamentul are o grupare  $-NH_2$  neutră) prin reacția cu un acid adecvat. Acizii adecvați pentru pregătirea sărurilor acide includ atât acizi organici (de exemplu acid acetic, acid propionic, acid glicolic, acid piruvic, acid oxalic, acid malic, acid malonic, acid succinic, acid maleic, acid fumaric, acid tartaric, acid citric, acid benzoic, acid cinamic, acid mandelic, acid metansulfonic, acid etansulfonic, acid p-toluensulfonic, acid salicilic și alții asemenea lor), cât și acizi anorganici, cum ar fi acidul clorhidric, acidul bromhidric, acidul sulfuric, acidul azotic, acidul fosforic și alții asemenea lor. Dimpotrivă, preparatele sărurilor bazice ale grupărilor acide care pot face parte din peptidă sunt preparate folosind o bază acceptabilă farmaceutic, cum ar fi hidroxidul de sodiu, hidroxidul de potasiu, hidroxidul de amoniu, hidroxidul de calciu, trimetilamina sau altele asemenea.

Intr-o concretizare preferată în mod special, compusul farmaceutic cuprinde peptidele sub forma unor săruri de acid acetic (acetați), trifluor-acetați sau săruri de acid clorhidric (cloruri).

Preferabil, medicamentul din prezenta invenție este unul imunoterapeutic, de exemplu un vaccin. Acesta poate fi administrat direct pacientului, în organul afectat sau administrat pe cale sistemică, i.d., i.m., s.c., i.p. și i.v. sau aplicat *ex vivo* celulelor preluate de la pacient sau unei linii de celule umane care sunt apoi administrate pacientului sau utilizate *in vitro* pentru selectarea unei subpopulații de celule imune derivate de la pacient, care sunt apoi readministrate pacientului. Dacă acidul nucleic este administrat celulelor *in vitro*, poate fi util ca celulele să fie transfectate astfel încât să coexprime citochine imunostimulatoare, cum este interleukina 2. Peptida poate fi substanțial pură sau combinată cu un adjuvant stimulator imun (vezi mai jos) ori poate fi utilizată în combinație cu citokine imunostimulatoare sau poate fi administrată cu un sistem de livrare adecvat, de exemplu lipozomi. De asemenea, peptida poate fi conjugată cu un transportor adecvat, cum ar fi hemocianina melcului *Megathura crenulata* (keyhole limpet hemocyanin, KLH) sau mannan (vezi WO 95/18145 și (Longenecker et al., 1993)). Peptida poate fi, de asemenea, țintită, o proteină de fuziune sau o moleculă hibridă. Se anticipează că peptidele a căror secvență este furnizată în prezenta descoperire vor stimula celule T CD4 sau CD8. Cu toate acestea, stimularea celulelor T CD8 este mai eficientă în prezența celulelor T helper CD4. În consecință, pentru epitopii MHC de clasă I care stimulează celulele T CD8, partenerul sau secțiunile de fuziune ale unei molecule hibride furnizează în mod adecvat epitopi care stimulează celule T CD4-pozitive. Epitopii care stimulează CD4 și CD8 sunt bine cunoscuți în domeniu și includ pe cei identificați în prezenta descoperire.

Intr-unul din aspecte, vaccinul cuprinde cel puțin o peptidă care are secvența de aminoacizi de la SEQ ID NO: 1 la SQ ID NO: 191 prezentată și cel puțin o peptidă suplimentară, de preferință două până la 50, mai preferabil două până la 25, chiar mai preferabil două până la 20 și cel mai preferabil două, trei, patru, cinci, șase, șapte, opt, nouă, zece, unsprezece, doisprezece, treisprezece, paisprezece, cincisprezece, șaisprezece, șaptesprezece sau optsprezece peptide. Peptida(e) poate (pot) fi preluată(e) din unul sau mai multe TAA specifice și se pot lega de molecule MHC de clasă I.

Un alt aspect al descoperirii furnizează un acid nucleic (de exemplu o polinucleotidă) care codifică o peptidă sau o variantă de peptidă din invenție. Polinucleotida poate fi, de exemplu, ADN, ADNc, APN, ARN sau o combinație a acestora, în helix simplu și/sau dublu sau în forme native sau stabilizate de polinucleotide, cum ar fi, de exemplu, polinucleotidele cu bază de fosforotioat și poate conține sau nu introni, cu condiția să codifice pentru peptidă. Desigur, numai peptidele care conțin resturi de aminoacid existente în mod natural și unite prin legături peptidice care apar în mod natural sunt codificabile de o polinucleotidă. Un alt aspect al descoperirii constă în furnizarea unui vector de expresie capabil să exprime o polipeptidă conform descoperirii.

Au fost dezvoltate mai multe metode de legare a polinucleotidelor, în special a ADN-ului, de vectori, de exemplu, prin terminale coezive complementare. De exemplu segmentului ADN i se pot adăuga regiuni homopolimerice complementare care să fie introduse în ADN-ul vector. Vectorul și segmentul ADN sunt apoi unite prin punți de hidrogen între cozile complementare homopolimer pentru a forma molecule ADN recombinante.

Agenții de legătură sintetici care conțin unul sau mai multe situri limitative oferă o modalitate alternativă de alăturare a segmentelor ADN la vectori. Agenții de legare care conțin o varietate de situri de endonucleaze de restricție sunt disponibili comercial de la mai multe surse, dintre care amintim pe International Biotechnologies Inc., New Haven, CN, SUA.

O metodă preferabilă de modificare a ADN-ului care codifică polipeptida din descoperire utilizează reacția de polimerază în lanț descrisă de Saiki RK et al. (Saiki et al., 1988). Această metodă poate fi utilizată pentru introducerea ADN-ului într-un vector potrivit, de exemplu prin implementarea în locații cu restricții adecvate, sau poate fi utilizată pentru modificarea ADN-ului în alte moduri utile, după cum este cunoscut în domeniu. În cazul utilizării unor vectori virali, sunt preferați vectorii virus variolic sau adenovirus.

ADN-ul (sau în cazul vectorilor retrovirali, ARN-ul) poate fi apoi exprimat într-o gazdă adecvată pentru a produce o polipeptidă compusă din peptidă sau varianta din descoperire. Prin urmare, ADN-ul care codifică peptida sau varianta din descoperire poate fi utilizat în conformitate cu tehnicile cunoscute, modificate corespunzător instrucțiunilor prezente, în vederea construirii unui vector de expresie, care este apoi utilizat pentru transformarea unei celule-gazdă corespunzătoare pentru exprimarea și producerea polipeptidei din descoperire. Astfel de tehnici includ cele descrise, de exemplu, în US 4,440,859, 4,530,901, 4,582,800, 4,677,063, 4,678,751, 4,704,362, 4,710,463, 4,757,006, 4,766,075 și 4,810,648.

ADN-ul (sau în cazul vectorilor retrovirali, ARN-ul) care codifică polipeptida care formează compusul din descoperire poate fi cuplat cu o mare varietate de alte secvențe ADN pentru introducerea într-o gazdă adecvată. ADN-ul insoțitor va depinde de natura gazdei, modul de introducere a ADN-ului în gazdă și dacă se dorește integrarea sau întreținerea episomală.

În general, ADN-ul este inserat într-un vector de expresie, cum ar fi o plasmidă, cu orientarea corectă și intervalul potrivit de citire pentru expresie. Dacă este necesar, ADN-ul poate fi corelat cu secvențele de nucleotide de transcriere și translație corespunzătoare, recunoscute de gazda dorită, cu toate că astfel de controale sunt disponibile în general în vectorul de expresie. Vectorul este apoi introdus în gazdă prin tehnicile standard. În general, nu toate gazdele vor fi transformate de vector. Prin urmare, va fi nevoie de selectarea unor celule-gazdă transformate. Una dintre tehnicile de selectare implică înglobarea în vectorul de exprimare a unei secvențe ADN cu toate elementele de control necesare, care să codifice o trăsătură selectabilă din celula transformată, cum ar fi de exemplu rezistența la antibiotic.

Alternativ, gena unei asemenea trăsături selectabile poate fi pe un alt vector, care este folosit pentru a cotransforma celula-gazdă dorită.

Celulele-gazdă care au fost transformate de ADN-ul recombinant din descoperire sunt apoi cultivate un timp suficient și în condiții corespunzătoare, cunoscute celor inițiați, în conformitate cu îndrumările din acest document, pentru a permite exprimarea polipeptidei, care poate fi apoi recuperată.

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

Prezenta descoperire este legată și de o serie de celule-gazdă transformate cu un vector polinucleotidic, creat în cadrul prezentei invenții. Celula-gazdă poate fi procariotă sau eucariotă. Este posibil ca celulele bacteriene să fie celule-gazdă procariote preferate în anumite circumstanțe și, de regulă, sunt o tulpină de *E. coli*, cum ar fi, de exemplu, tulpinile *E. coli* DH5, disponibile de la Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, SUA, și RR1, disponibile de la American Type Culture Collection (ATCC) din Rockville, MD, SUA (No ATCC 31343). Printre celulele-gazdă eucariote se numără celulele de drojdie, insecte și mamifere, de preferință celule de vertebrate precum cele de la șoarece, șobolan, maimuță sau linii de celule fibroblastice sau de colon umane. Celulele-gazdă provenite din drojii includ YPH499, YPH500 și YPH501, care sunt disponibile în general de la Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA92037, SUA. Celulele-gazdă preferate provenite de la mamifere includ celulele ovariene de hamster chinezesc, disponibile de la ATCC ca CCL61, celulele embrionare de cobai NIH elvețian, NIH/3T3 disponibile de la ATCC ca CRL 1658, celulele COS-1 derivate din rinichii de maimuță disponibile de la ATCC ca CRL 1650 și celulele 293 care sunt celule embrionare renale umane. Celulele preferate provenite de la insecte sunt celulele Sf9 care pot fi

transfectate cu vectori de exprimare a baculovirusului. O prezentare generală a opțiunilor de celule-gazdă adecvate poate fi găsită, de exemplu, în manualul scris de Paulina Balbas și Argelia Lorence „Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols”, Partea I, ediția a doua, ISBN 978-1-58829-262-9 și în alte lucrări cunoscute în domeniu.

5 Transformarea celulelor-gazdă adecvate cu un produs ADN obținut pe baza acestui patent este realizată folosind metode bine cunoscute care depind de obicei de tipul de vector folosit. În ceea ce privește transformarea celulelor-gazdă procariote, vezi, de exemplu, Cohen et al. (Cohen et al., 1972) și (Green and Sambrook, 2012). Transformarea celulelor de drojdie este descrisă în Sherman et al. (Sherman et al., 1986). Metoda lui Beggs (Beggs, 1978) este, de asemenea, utilă. Referitor la  
10 celulele de la vertebrate, reactivii utili în transferul unor astfel de celule, de exemplu, formule pe bază de fosfat de calciu și DEAE-dextran sau lipozom, sunt disponibili de la Stratagene Cloning Systems sau de la Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD20877, SUA. Electro-permeabilizarea este de asemenea utilă pentru transformarea și/sau transfectarea celulelor și este o metodă bine cunoscută pentru transformarea celulelor provenite din drojdie, bacterii, insecte și a celulelor vertebrate.

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

Se va aprecia că anumite celule-gazdă din cadrul descoperirii sunt utile în pregătirea peptidei din descoperire, de exemplu celule de bacterii, de levuri și de insecte. Totuși, și alte celule-gazdă pot  
20 fi utile pentru anumite metode terapeutice. De exemplu, celulele prezentatoare de antigen, cum ar fi celulele dendritice, pot fi și ele utile pentru exprimarea peptidelor din descoperire, astfel încât să fie încărcate în moleculele MHC adecvate. Prin urmare, această invenție prezintă o celulă-gazdă, compusă dintr-un acid nucleic, sau un vector de exprimare, conform invenției.

Intr-o integrare optimă, celula-gazdă este o celulă prezentatoare de antigen, în particular o  
25 celulă dendritică sau o celulă prezentatoare de antigen. Celulele APC încărcate cu o proteină de fuziune recombinantă, care conține fosfatază acidă prostatică (PAP), sunt în prezent în curs de investigare de către U.S. Food and Drug Administration (FDA) la data de 29 aprilie 2010 pentru tratamentul cancerului de prostată asimptomatic sau minim simptomatic (Sipuleucel-T) (Rini et al., 2006; Small et al., 2006).

30 Un alt aspect al invenției se referă la o metodă de producere a unei peptide sau a variantei sale, metoda cuprinzând cultivarea unei celule-gazdă și izolarea peptidei din celula-gazdă sau din mediul său de cultură.

În altă integrare a peptidei, acidul nucleic sau vectorul de expresie inventat este utilizat în  
35 medicină. De exemplu, peptida sau varianta acesteia poate fi pregătită pentru injectare intravenoasă (i.v.), injectare subcutanată (s.c.), injectare intradermică (i.d.), injectare intraperitoneală (i.p.) sau injectare intramusculară (i.m.). Metodele preferate de administrare injectabilă pentru peptidă sunt s.c., i.d., i.p., i.m. și i.v. Metodele preferate de administrare injectabilă pentru ADN sunt i.d., i.m., s.c., i.p. și i.v. Pot fi date doze de peptidă și ADN cuprinse, de exemplu, între 50 μg și 1,5 mg, preferabil între  
40 125 μg și 500 μg, și vor depinde de peptida sau ADN-ul respectiv. Dozele din acest interval au fost utilizate cu succes în studii anterioare (Walter et al., 2012).

Polinucleotida utilizată pentru vaccinare activă poate fi substanțial pură sau poate fi conținută  
de un vector sau de un sistem de livrare adecvat. Acidul nucleic poate fi ADN, ADNc, APN, ARN sau o combinație dintre acestea. Metodele pentru conceperea și introducerea unui astfel de acid nucleic sunt bine cunoscute în domeniu. O prezentare generală este furnizată, de exemplu, de Teufel et al.  
45 (Teufel et al., 2005). Vaccinurile polinucleotidice sunt ușor de preparat, însă modul de acțiune al acestor vectori în inducerea unui răspuns imunitar nu este pe deplin înțeles. Printre vectorii și sistemele de livrare adecvate se numără ADN-ul și/sau ARN-ul viral, cum ar fi sistemele bazate pe adenovirus, virusul vaccinia, retrovirusuri, adenovirusuri asociate sau hibrizi care conțin elemente din  
50 mai multe virusuri. Printre sistemele de livrare nevirale se numără lipide cationice și polimeri cationici, bine cunoscuți în domeniul livrării ADN-ului. Se poate folosi administrarea fizică, cum ar fi cea pe calea unui „pistol genic”. Peptida sau peptidele codificată(e) de acidul nucleic poate (pot) fi o proteină de fuziune, de exemplu cu un epitop care stimulează celulele T pentru celula CDR opusă respectivă, după cum s-a observat mai sus.

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

Intr-o formulare preferată a compusului farmaceutic conform invenției, adjuvantul este  
selecționat dintr-un grup care constă din factori stimulatori ai coloniilor, cum ar fi factorul stimulator  
60 al coloniilor de granulocite macrofage (GM-CSF, sargramostim), ciclofosamidă, imiquimod, resiquimod și interferon alfa.

În concretizarea preferată a compusului farmaceutic conform invenției adjuvantul este selecționat dintr-un grup care constă din factori stimulatori ai coloniilor, cum ar fi factorul stimulator al coloniilor de granulocite macrofage (GM-CSF, sargramostim), ciclofosfamidă, imiquimod și resiquimod. În formularea preferată a compusului farmaceutic conform invenției, adjuvantul este ciclofosfamidă, imiquimod sau resiquimod. Adjuvanții și mai preferați sunt Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, poly-ICLC (Hiltonol®) și anti-CD40 mAB sau combinații ale acestora.

Această compoziție este folosită pentru administrare parenterală, cum ar fi subcutanată, intradermică, intramusculară sau orală. Pentru aceasta, peptidele și opțional alte molecule sunt dizolvate sau în suspensie într-un mediu de transport (transportor) farmacologic acceptabil, preferabil apos. În plus, compoziția poate conține excipienți, cum ar fi tampoane, agenți de legare, agenți explozivi, diluanți, arome, lubrifianți etc. Peptidele pot fi, de asemenea, administrate împreună cu substanțe care stimulează imunitatea, cum ar fi citokinele. Lista exhaustivă de excipienți care se pot folosi în această compoziție poate, de exemplu, fi preluată din A. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients (Kibbe, 2000). Compoziția poate fi folosită pentru prevenirea, profilaxia și/sau tratamentul bolilor adenomatoase sau canceroase. Exemple de formule pot fi găsite, de exemplu, în EP2113253.

Este important de înțeles că răspunsul imunitar declanșat de vaccin în conformitate cu invenția atacă cancerul în diferite stadii celulare și în diferite stadii de dezvoltare. Mai mult, sunt atacate diferite căi de semnalizare asociate cancerului. Acesta este un avantaj față de vaccinurile care vizează doar una sau câteva ținte, ceea ce poate determina adaptarea ușoară a tumorii la atac (evadare a tumorii). Mai mult, nu toate tumorile individuale exprimă același model de antigeni. Prin urmare, o combinație de mai multe peptide asociate tumorii asigură faptul că fiecare tumoră poartă cel puțin unele dintre ținte. Compoziția este concepută astfel încât fiecare tumoră este de așteptat să exprime mai mulți dintre antigeni și să acopere mai multe căi independente necesare pentru creșterea și menținerea tumorii. Astfel, vaccinul poate fi „de uz general” pentru o populație mai mare de pacienți. Acest lucru înseamnă că o preselecție a pacienților care urmează să fie tratați cu vaccinul poate fi restricționată la tiparea HLA, nu necesită evaluări suplimentare ale biomarkerului pentru exprimarea antigenului, dar este totuși asigurat că mai multe ținte sunt atacate simultan de răspunsul imunitar indus, ceea ce este important pentru eficacitate (Banchereau et al., 2001; Walter et al., 2012).

Peptida din prezenta invenție se poate folosi pentru a genera și a dezvolta anticorpi specifici contra complexelor MHC/peptidă. Acestea se pot folosi pentru tratament, direcționarea toxinelor sau substanțelor radioactive către țesutul bolnav. O altă utilizare a acestor anticorpi poate fi țintirea radionuclizilor către țesutul bolnav în scopuri imagistice, cum ar fi PET. Această utilizare poate ajuta la depistarea metastazelor mici sau pentru stabilirea dimensiunii și localizării exacte a țesutului bolnav.

Prin urmare, un alt aspect al invenției este furnizarea unei metode pentru producerea unui anticorp recombinant care se leagă în mod specific la un complex major de histocompatibilitate (MHC) de clasă I sau II uman care este complexat cu un antigen HLA-restricționat, metoda cuprinzând: imunizarea unui mamifer non-uman modificat genetic care cuprinde celule care exprimă respectivul complex major de histocompatibilitate (MHC) de clasă I sau II uman cu o formă solubilă a moleculei MHC de clasă I sau II complexate cu respectivul antigen HLA-restricționat; izolarea moleculelor ARNm din celulele producătoare de anticorp ale respectivului mamifer non-uman; producerea unei biblioteci de prezentare a fagilor care prezintă molecule de proteină codificate de respectivele molecule ARNm; și izolarea cel puțin a unui fag din respectiva bibliotecă de prezentare a fagilor, cel puțin un fag care prezintă anticorpul respectiv cu legare specifică la complexul major de histocompatibilitate (MHC) de clasă I sau II uman complexat cu antigenul HLA-restricționat menționat.

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

Metodele respective pentru producerea unor astfel de anticorpi și complexe majore de histocompatibilitate de clasă I cu catenă unică, precum și alte instrumente pentru producerea acestor anticorpi sunt descrise în WO 03/068201, WO 2004/084798, WO 01/72768, WO 03/070752 și în publicații (Cohen et al., 2003a; Cohen et al., 2003b; Denkberg et al., 2003), care, în scopul prezentei invenții, sunt toate încorporate în mod explicit prin referință în ansamblul lor.

Preferabil, anticorpul se leagă la complex cu o afinitate de legare mai mică de 20 nanomolari, preferabil sub 10 nanomolari, care este, de asemenea, considerată ca fiind „specifică” în contextul prezentei invenții.

Prezenta descoperire se referă la o peptidă care cuprinde o secvență care este selectată din grupul format din SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 191 sau o variantă a acesteia care este cel puțin

88% omologă (de preferință identică) cu SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 191 sau o variantă a acesteia care induce celule T care reacționează încrucișat cu peptida menționată, în care peptida menționată nu este polipeptida de bază cu lungime completă.

5 Prezentă invenție se referă în continuare la o peptidă care cuprinde o secvență care este selectată din grupul format din SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 191 sau o variantă a acesteia care este cel puțin 88% omologă (de preferință identică) cu SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 191, în care peptida menționată sau varianta acesteia are o lungime totală între 8 și 100, de preferință între 8 și 30 și, cel mai preferat, între 8 și 14 aminoacizi.

10 Prezentă invenție se referă și la peptidele în conformitate cu invenția și care au capacitatea de a se lega la o moleculă a complexului major de histocompatibilitate (MHC) uman de clasă I sau de clasă II.

Prezentă invenție se referă și la peptidele în conformitate cu invenția care constau în esență dintr-o secvență de aminoacizi conformă cu SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 191.

15 Prezentă invenție se referă, de asemenea, la peptidele în conformitate cu invenția, în care respectiva peptidă este modificată (chimic) și/sau include legături non-peptidice.

Prezentă invenție se referă suplimentar la peptidele în conformitate cu invenția, în care peptida face parte dintr-o proteină de fuziune, care cuprinde în special aminoacizi N-terminali ai lanțului invariant (Ii) asociat cu antigenul HLA-DR sau în care peptida este fuzionată cu (sau în) un anticorp, cum ar fi, de exemplu, un anticorp care este specific pentru celulele dendritice.

20 Prezentă invenție se referă în plus la un acid nucleic care codifică peptidele în conformitate cu invenția, cu condiția ca peptida să nu fie proteina umană completă (întregă).

Prezentă invenție se referă în continuare la acidul nucleic în conformitate cu invenția, care este ADN, ADNc, APN, ARN sau combinații ale acestora.

25 Prezentă invenție se referă în continuare la un vector de exprimare capabil să exprime un acid nucleic conform prezentei invenții.

Prezentă invenție se referă în continuare la o peptidă conform prezentei invenții, un acid nucleic conform prezentei invenții sau un vector de exprimare conform prezentei invenții pentru utilizare în medicină, în special în tratarea CRC.

30 Prezentă invenție se referă în continuare la o celulă-gazdă cuprinzând un acid nucleic conform invenției sau un vector conform invenției.

Prezentă invenție se referă, de asemenea, la celula-gazdă în conformitate cu prezenta invenție care este o celulă prezentatoare de antigen și, preferabil, este o celulă dendritică.

35 Prezentă invenție se referă în continuare la o metodă de producere a unei peptide în conformitate cu prezenta invenție, metoda cuprinzând cultivarea celulei-gazdă conform prezentei invenții și izolarea peptidei din celula-gazdă sau din mediul său de cultură.

Prezentă invenție se referă în continuare la metoda în conformitate cu prezenta invenție în care antigenul este încărcat pe molecule de MHC de clasă I sau II exprimate pe suprafața unei celule prezentatoare de antigen adecvate prin punerea în contact a unei cantități suficiente de antigen cu o celulă prezentatoare de antigen.

40 Prezentă invenție se referă în continuare la metoda în conformitate cu invenția, în care celula prezentatoare de antigen cuprinde un vector de exprimare capabil să exprime respectiva peptidă care conține SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 191 sau varianta menționată de secvență de aminoacizi.

45 Prezentă invenție se referă în continuare la celulele T activate produse prin metoda în conformitate cu prezenta invenție, în care celulele T menționate recunosc selectiv o celulă care exprimă în mod aberant o polipeptidă cuprinzând o secvență de aminoacizi în conformitate cu prezenta invenție.

50 Prezentă invenție se mai referă și la o metodă de distrugere a celulelor țintă la un pacient la care celulele țintă exprimă aberant o polipeptidă cuprinzând orice secvență de aminoacizi în conformitate cu prezenta invenție, metoda cuprinzând administrarea, la pacient, a unui număr eficace de celule T în conformitate cu prezenta invenție.

55 Prezentă invenție se referă, de asemenea, la utilizarea oricărei peptide descrise, a unui acid nucleic în conformitate cu prezenta invenție, a unui vector de exprimare în conformitate cu prezenta invenție, a unei celule în conformitate cu prezenta invenție sau a unei limfocite T citotoxice activate în conformitate cu prezenta invenție ca medicament sau în fabricarea unui medicament. Prezentă invenție se referă, de asemenea, la o utilizare în conformitate cu prezenta invenție în care respectivul medicament este activ împotriva cancerului.

Prezentă invenție se referă, de asemenea, la o utilizare în conformitate cu invenția în care medicamentul este un vaccin. Prezentă invenție se referă, de asemenea, la o utilizare în conformitate cu invenția în care medicamentul este activ împotriva cancerului.

60 Prezentă invenție se mai referă la o utilizare în conformitate cu invenția, în care celulele canceroase menționate sunt celule de CRC sau alte celule tumorale solide sau hematologice, cum ar fi

cancer pulmonar, cancer cerebral, cancer de stomac, cancer renal, cancer hepatic, cancer pancreatic, cancer de prostată, leucemie, cancer de glandă mamară, carcinom cu celule Merkel, melanom, cancer ovarian și cancer esofagian.

Prezenta descoperire se referă în continuare la proteine marker și biomarkeri particulari pe baza peptidelor din prezenta invenție, numite în prezentul document „ținte”, care pot fi utilizate în diagnosticarea și/sau prognosticul CRC. Prezenta invenție se referă, de asemenea, la utilizarea acestor ținte noi pentru tratarea cancerului.

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

Ori de câte ori este posibil, anticorpii invenției pot fi achiziționați din surse comerciale. Anticorpii conform invenției pot fi generați, de asemenea, folosindu-se metode bine cunoscute. Specialiștii în domeniu vor înțelege că pot fi utilizate fie polipeptide markeri de CRC de lungime completă, fie fragmente ale acestora pentru generarea anticorpilor în conformitate cu invenția. O polipeptidă de utilizat pentru generarea unui anticorp al invenției poate fi purificată parțial sau complet dintr-o sursă naturală sau poate fi produsă utilizându-se tehnici cu ADN recombinant.

De exemplu, un ADNc care codifică o peptidă conform prezentei invenții, cum ar fi o peptidă cu SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 191, o polipeptidă ori o variantă sau un fragment al acesteia, poate fi exprimat în celule procariote (de exemplu, bacterii) sau celule eucariote (de exemplu, celule de drojii, de insecte sau de mamifere), după care proteina recombinantă poate fi purificată și utilizată pentru a genera un preparat de anticorpi monoclonali sau policlonali care leagă în mod specific polipeptida marker de CRC utilizată pentru a genera anticorpii, conform invenției.

Un specialist în domeniu va realiza că generarea a două sau mai multe seturi diferite de anticorpi monoclonali sau policlonali maximizează probabilitatea obținerii unui anticorp cu specificitatea și afinitatea necesare utilizării sale preconizate (de exemplu, ELISA, imunohistochimie, imagistică *in vivo*, terapie cu imunotoxine). Anticorpii sunt testați pentru activitatea dorită prin metode cunoscute, în conformitate cu scopul pentru care anticorpii urmează să fie utilizați (de exemplu, ELISA, imunohistochimie, imunoterapie etc.), pentru îndrumări suplimentare privind generarea și testarea anticorpilor (vezi, de exemplu, Greenfield, 2014 (Greenfield, 2014)). De exemplu, anticorpii pot fi testați în teste ELISA, imunoamprente (Western blots), colorare imunohistochimică a cancerelor fixate cu formalină sau secțiuni de țesut înghețat. După caracterizarea inițială *in vitro*, anticorpii destinați utilizării diagnostice terapeutice sau *in vivo* sunt testați conform metodelor cunoscute de testare clinică.

Termenul „anticorp monoclonal”, așa cum este utilizat aici, se referă la un anticorp obținut dintr-o populație substanțial omogenă de anticorpi, adică anticorpii individuali cuprinzând populația sunt identici, cu excepția mutațiilor posibile în mod natural care pot fi prezente în cantități minore. Anticorpii monoclonali descriși în mod specific includ anticorpi „himerici”, în care o porțiune din catena grea și/sau ușoară este identică sau omologă cu secvențele corespunzătoare din anticorpi derivați dintr-o specie particulară sau aparținând unei anumite clase sau subclase de anticorpi, în timp ce restul catenei (catenelor) este identic sau omolog cu secvențele corespunzătoare din anticorpii derivați de la o altă specie sau aparținând unei alte clase sau subclase de anticorpi, precum și fragmente ale unor astfel de anticorpi, atât timp cât aceștia prezintă activitatea antagonistă dorită (US 4,816,567, care este incorporat aici integral).

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

Anticorpii monoclonali pot fi obținuți, de asemenea, prin metode de ADN recombinant, cum ar fi cele descrise în US 4,816,567. ADN-ul care codifică anticorpii monoclonali ai invenției poate fi izolat ușor și secvențializat utilizându-se proceduri convenționale (de exemplu, prin utilizarea probelor oligonucleotidice care sunt capabile să se lege în mod specific la genele codificatoare ale catenelor grele și ușoare ale anticorpilor murinici).

Metodele *in vitro* sunt, de asemenea, adecvate pentru prepararea anticorpilor monovalenți. Digestia anticorpilor pentru a produce fragmente ale acestora, în particular fragmente Fab, poate fi realizată folosindu-se tehnici de rutină cunoscute în domeniu. De exemplu, digestia poate fi efectuată folosindu-se papaină. Exemple de digestie cu papaină sunt descrise în WO 94/29348 și US 4,342,566.

Digestia cu papaină a anticorpilor produce, de obicei, două fragmente identice de legare la antigen, numite fragmente Fab, fiecare cu un singur situs de legare a antigenului și un fragment Fc rezidual. Tratamentul pepsinei generează un fragment F(ab')<sub>2</sub> și un fragment pFc'.

5       Fragmentele de anticorpi, fie că sunt atașate la alte secvențe sau nu, pot include de asemenea inserții, deleții, substituții sau alte modificări selectate ale unor regiuni particulare sau reziduuri specifice de aminoacizi, cu condiția ca activitatea fragmentului să nu fie modificată sau degradată în mod semnificativ față de anticorpus neschimbat sau fragmentul de anticorp. Aceste modificări pot furniza unele proprietăți suplimentare, cum ar fi eliminarea/adăugarea de aminoacizi capabili de  
10       legare la disulfuri, creșterea biolongevității, modificarea caracteristicilor secretoare etc. În orice caz, fragmentul de anticorp trebuie să aibă o proprietate bioactivă, cum ar fi activitatea de legare, reglarea legării la domeniul de legare, etc. Regiunile funcționale sau active ale anticorpului pot fi identificate prin mutageneza unei regiuni specifice a proteinei, urmată de exprimarea și testarea polipeptidului exprimat. Astfel de metode sunt ușor de înțeles pentru un specialist în domeniu și pot include mutageneza specifică situsului acidului nucleic care codifică fragmentul de anticorp.

15       Anticorpii conform invenției pot cuprinde suplimentar anticorpi umanizați sau anticorpi umani. Formele umanizate ale anticorpilor non-umani (de exemplu, murini) sunt imunoglobuline himerice, catene de imunoglobulină sau fragmente ale acestora (cum ar fi Fv, Fab, Fab' sau alte subsecvențe de legare la antigenului ale anticorpilor) care conțin o secvență minimă derivată din imunoglobulină non-umană. Anticorpii umanizați includ imunoglobuline umane (anticorp receptor) în  
20       care resturile dintr-o regiune determinantă complementară (CDR) a recipientului sunt înlocuite cu resturi dintr-o CDR a unei specii non-umane (anticorp donor), de exemplu de șoarece, șobolan sau iepure cu specificitatea, afinitatea și capacitatea dorite. În unele cazuri, resturile de cadru Fv (FR) ale imunoglobulinei umane sunt înlocuite cu resturi non-umane corespunzătoare. Anticorpii umanizați pot cuprinde, de asemenea, resturi care nu se găsesc nici în anticorpus receptor, nici în secvențele de CDR sau de cadru importate. În general, anticorpus umanizat va cuprinde, practic, toate cel puțin unul și, de  
25       obicei, două domenii variabile în care toate sau, practic, toate regiunile CDR corespund cu cele ale unei imunoglobuline non-umane și toate sau, practic, toate regiunile FR sunt cele ale unei secvențe de consens a imunoglobulinelor umane. Anticorpus umanizat optim va cuprinde, de asemenea, cel puțin o porțiune dintr-o regiune constantă de imunoglobulină (Fc), de obicei cea a unei imunoglobuline  
30       umane.

      Metodele de umanizare a anticorpilor non-umani sunt bine cunoscute în domeniu. În general, un anticorp umanizat are unul sau mai multe resturi de aminoacid introduse în el dintr-o sursă non-umană. Aceste reziduuri de aminoacid non-umane sunt adesea denumite reziduuri de „import”, care sunt, de obicei, luate dintr-un domeniu variabil de „import”. Umanizarea poate fi realizată, practic,  
35       prin substituirea CDR-urilor sau a secvențelor CDR de la rozătoare pentru secvențele corespunzătoare unui anticorp uman. În consecință, astfel de anticorpi „umanizați” sunt anticorpi himerici (US 4,816,567), în care, practic, mai puțin de un domeniu variabil uman intact a fost substituit cu secvența corespunzătoare de la o specie non-umană. În practică, anticorpii umanizați sunt, de obicei, anticorpi umani în care unele resturi CDR și, posibil, unele resturi FR sunt substituite cu resturi din situsuri analoge în anticorpi de la rozătoare.

      Pot fi folosite animale transgenice (de exemplu, șoareci), care sunt capabile, după imunizare, să producă un repertoriu complet de anticorpi umani în absența producției de imunoglobulină endogenă. De exemplu, a fost descris că deleția homozigotă a genei regiunii de legare a catenei grele de anticorp la șoareci mutanți himeric și de filiație germinală conduce la inhibarea completă a  
45       producției de anticorpi endogeni. Transferul seriei de gene de imunoglobulină cu filiație germinală umană în astfel de șoareci mutanți cu filiație germinală va conduce la producerea de anticorpi umani după provocarea de către un antigen. Anticorpii umani pot fi, de asemenea, produși în biblioteci de afișare a fagilor.

      Anticorpii din invenție sunt, preferabil, administrați unui subiect într-un agent purtător acceptabil din punct de vedere farmaceutic. În mod obișnuit, o cantitate adecvată dintr-o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic este utilizată în formulă pentru a face formularea izotonică. Exemplele de agent purtător acceptabil din punct de vedere farmaceutic includ soluția salină, soluția Ringer și soluția de dextroză. pH-ul soluției este, preferabil, de la aproximativ 5 la  
50       aproximativ 8 și, mai preferabil, de la aproximativ 7 până la aproximativ 7,5. Agenții purtători suplimentari includ preparate cu eliberare prelungită, de exemplu matrice semipermeabile de polimeri hidrofobi solizi care conțin anticorpus, matricele fiind sub formă de articole formate, de exemplu, pelicule, lipozomi sau microparticule. Va fi evident pentru persoanele de specialitate din domeniu că anumiți agenți purtători pot fi mai preferabili în funcție de, de exemplu, calea de administrare și concentrația anticorpului care este administrat.

60       Anticorpii pot fi administrați subiectului, pacientului sau celulei prin injecție (de exemplu, intravenoasă, intraperitoneală, subcutanată, intramusculară) sau prin alte metode, cum ar fi perfuzia,

care asigură eliberarea sa în sânge într-o formă eficace. De asemenea, anticorpii pot fi administrați pe căi intratumorale sau peritumorale pentru a exercita efecte terapeutice locale, precum și sistemice. Este preferabilă injectarea locală sau intravenoasă.

5 Dozele și schemele eficace pentru administrarea anticorpilor pot fi determinate empiric și realizarea unor astfel de determinări se află în domeniul de specialitate. Specialiștii în domeniu vor înțelege că doza de anticorpi care trebuie administrată va varia în funcție de, de exemplu, subiectul care va primi anticorpul, calea de administrare, de tipul particular de anticorp utilizat și alte medicamente administrate. O doză zilnică tipică de anticorp utilizat singur poate varia de la 10 aproximativ 1 μg/kg până la 100 mg/kg de greutate corporală sau mai mult pe zi, în funcție de factorii menționați mai sus. După administrarea unui anticorp, preferabil pentru tratarea CRC, eficacitatea anticorpului terapeutic poate fi evaluată în diverse moduri bine cunoscute de către specialiștii în domeniu. De exemplu, mărimea, numărul și/sau distribuția cancerului la un subiect care primește tratament pot fi monitorizate utilizându-se tehnici standard de imagistică tumorală. Un anticorp administrat terapeutic care oprește creșterea tumorii, are ca rezultat contracția tumorală și/sau 15 împiedică dezvoltarea de tumori noi în comparație cu evoluția bolii care ar avea loc în absența administrării anticorpului este un anticorp eficace pentru tratamentul cancerului.

Un alt aspect al invenției este acela de a furniza o metodă pentru producerea unui receptor de celule T solubil (sTCR) care să recunoască un complex peptidă-MHC specific. Astfel de receptori de celule T solubili pot fi generați din clone de celule T specifice și afinitatea lor poate fi crescută prin 20 mutagenază care vizează regiunile determinante de complementaritate. În scopul selectării receptorilor de celule T, poate fi utilizat o afișare de fagi (US 2010/0113300, (Liddy et al., 2012)). În scopul stabilizării receptorilor celulelor T în timpul afișării fagilor și în cazul utilizării practice ca medicament, catena alfa și catena beta pot fi legate, de exemplu, prin legături disulfidice non-native, alte legături covalente (receptor de celulă T cu o singură catenă) sau prin domenii de dimerizare 25 (Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999). Receptorul de celule T poate fi legat de toxine, medicamente, citokine (a se vedea, de exemplu, US 2013/0115191), domenii care recrutează celule efectoare precum domeniul anti-CD3, etc. pentru a executa anumite funcții asupra celulelor-țintă. Mai mult, poate fi exprimată în celule T utilizate pentru transferul adoptiv. Informații suplimentare pot fi găsite în WO 2004/033685A1 și WO 2004/074322A1. O combinație de sTCR-uri este descrisă în WO 2012/056407A1. Alte metode pentru producere sunt prezentate în WO 30 2013/057586A1.

În plus, peptidele și/sau TCR-urile ori anticorpii sau alte molecule de legare din prezenta descoperire pot fi utilizate pentru a verifica diagnosticul de cancer de la un patolog pe baza unei probe biopsiate.

35 Anticorpii sau TCR-urile pot fi utilizate, de asemenea, pentru teste diagnostice *in vivo*. În general, anticorpii sunt etichetați printr-o radionucleotidă (cum ar fi <sup>111</sup>In, <sup>99</sup>Tc, <sup>14</sup>C, <sup>131</sup>I, <sup>3</sup>H, <sup>32</sup>P sau <sup>35</sup>S), astfel încât tumora să poată fi localizată folosind imunoscintigrafie. Într-una dintre realizări, anticorpii sau fragmentele acestora se leagă la domeniile extracelulare a două sau mai multe ținte ale unei proteine selectate din grupul format din proteinele menționate mai sus, iar valoarea de afinitate 40 (Kd) este mai mică de 1 x 10 μM.

Anticorpii pentru utilizare diagnostică pot fi etichetați cu sonde adecvate pentru detectarea prin diferite metode imagistice. Metodele pentru detectarea sondelor includ, dar nu se limitează la, fluorescență, lumină, microscopie confocală și electronică; imagistică prin rezonanță magnetică și spectroscopie; fluoroscopie, tomografie computerizată și tomografie cu emisie de pozitroni. Sondele 45 adecvate includ, dar nu se limitează la, fluoresceină, rodamină, eozină și alți fluorofori, radioizotopi, aur, gadolinu și alte lantanide, fier paramagnetic, fluor-18 și alți radionuclizi cu emisie de pozitron. În plus, probele pot fi bi- sau multifuncționale și pot fi detectate folosind una sau mai multe dintre metodele prezentate aici. Acești anticorpi pot fi marcați direct sau indirect cu sondele menționate. Atașarea probelor la anticorpi implică atașarea covalentă a probei, încorporarea probei în anticorp și 50 atașarea covalentă a unui compus chelator pentru legarea probei, printre alte acțiuni bine cunoscute în domeniu. Pentru imunohistochimie, proba de țesut bolnav poate fi proaspătă sau congelată ori poate fi încorporată în parafină și fixată cu un conservant, cum ar fi formalina. Secțiunea fixată sau încorporată care conține proba întră în contact cu un anticorp etichetat principal și cu un anticorp secundar, anticorp folosit pentru a detecta exprimarea proteinelor *in situ*.

55 Un alt aspect al acestei invenții include o metodă *in vitro* de producere a celulelor T activate, metoda constând în contactarea celulelor T *in vitro* cu molecule MHC umane încărcate cu antigen, exprimate pe suprafața unei celule prezentatoare de antigen adecvate, pentru o perioadă de timp suficientă pentru activarea celulelor T într-un mod specific antigenului, antigenul fiind o peptidă conform invenției. Este de preferat să se utilizeze o cantitate suficientă de antigen împreună cu celula 60 prezentatoare de antigen.

Este de preferat o celulă de mamifer, care are un nivel redus sau inexistent de funcționare ca transportator de peptidă TAP. Printre celulele adecvate, care nu sunt transportatoare de peptidă TAP se numără celulele T2, RMA-S și *Drosophila*. TAP este transportatorul asociat cu procesarea antigenului.

5 Linia de celule umane T2 deficiente în încărcarea peptidei este disponibilă de la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA, având Nr. de catalog CRL 1992; linia de celule *Drosophila*, linia Schneider 2 este disponibilă de la ATCC cu NR. de catalog CRL 19863; linia de celule RMA-S de șoarece este descrisă în Ljunggren et al. (Ljunggren and Karre, 1985).

10 De preferință, înainte de transfectare, celula-gazdă nu exprimă în mod substanțial nicio moleculă MHC de clasă I. Este, de asemenea, de preferat ca celula stimulatoră să exprime o moleculă importantă pentru furnizarea unui semnal de costimulare pentru celule T, cum ar fi oricare dintre B7.1, B7.2, ICAM-1 și LFA3. Secvențele de acid nucleic ale numeroase molecule de MHC de clasă I și ale moleculelor de costimulator sunt disponibile public în bazele de date GenBank și EMBL.

15 În cazul unui epitop MHC de clasă I utilizat ca antigen, celulele T sunt celule T CD8- pozitive.

Dacă o celulă care prezintă antigen este transfectată pentru a exprima un astfel de epitop, este de preferat ca celula să conțină un vector capabil să exprime peptida care conține SEQ. ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 191.

20 Se pot folosi o serie de alte metode pentru generarea celulelor T *in vitro*. De exemplu, în generarea CTL pot fi folosite limfocite cu infiltrare tumorală autologă. Plebanski et al. (Plebanski et al., 1995) au utilizat limfocite autologe din sânge periferic (PLB) în pregătirea celulelor T. Mai mult, este posibilă producerea de celule T autologe prin pulsarea de celule dendritice cu peptidă sau polipeptidă sau prin infectare cu un virus recombinant. De asemenea, pot fi folosite celule B pentru producerea de celule T autologe. În plus, celulele macrofage pulsate cu peptidă sau polipeptidă sau infectate cu virus recombinant pot fi utilizate pentru prepararea de celule T autologe. S. Walter et al. (Walter et al., 2003) descriu pregătirea *in vitro* a celulelor T prin utilizarea de celule prezentatoare de antigen artificiale (aAPC), aceasta reprezentând, de asemenea, o modalitate potrivită de generare de celule T pentru peptida aleasă. În prezenta invenției, celulele aAPC au fost generate prin cuplarea unor complexe de peptide MHC preformate pe suprafața unor particule de polistiren (microgranule) prin biochimie biotină:streptavidină. Acest sistem permite controlul exact al densității MHC pe celulele aAPC, fapt ce permite amplificarea selectivă a răspunsurilor de aviditate ridicată sau scăzută a celulei T specifice antigenului cu eficiență crescută, din probele de sânge. Pe lângă complexele MHC:peptidă, celulele aAPC trebuie să poarte alte proteine cu activitate de costimulare, cum ar fi anticorpi anti-CD28 cuplați pe suprafețele lor. Mai mult, astfel de sisteme bazate pe aAPC necesită adesea adăugarea unor factori solubili adecvați, de exemplu citokine precum interleukina12.

30 Pentru pregătirea celulelor T se pot utiliza, de asemenea, celule alogene, iar o metodă este descrisă detaliat în WO 97/26328, încorporată în prezentul document prin referință. De exemplu, pe lângă celulele de *Drosophila* și celulele T2, se pot utiliza și alte celule pentru prezentarea antigenilor, cum ar fi celule CHO, celule de insecte infectate cu bacilovirus, bacterii, drojdii, celule țintă infectate cu vaccin. În plus, se pot utiliza virusuri din plante (a se vedea, de exemplu, Porta et al. (Porta et al., 1994), care descriu dezvoltarea virusului mozaicului din *Vigna unguiculata*, ca fiind un sistem cu productivitate ridicată pentru prezentarea de peptide străine).

45 Celulele T activate care sunt orientate spre peptida din invenție sunt utile în terapie. Astfel, un aspect suplimentar al invenției constă în descrierea celulelor T activate care se pot obține prin metodele anterior menționate în această invenție.

Celulele T activate, care sunt produse de metoda de mai sus, vor recunoaște selectiv o celulă care exprimă aberant o polipeptidă ce conține o secvență de aminoacizi cu SEQ ID NO: 1 până la SEQ ID NO: 191.

50 Este de preferat ca celula T să recunoască celula interacționând prin TCR cu complexul HLA/peptidă (de exemplu, legare). Celulele T sunt utile într-o metodă de distrugere a celulelor țintă la un pacient ale cărui celule țintă exprimă aberant o polipeptidă care conține o secvență de aminoacizi din invenție, atunci când pacientului îi este administrat un număr eficient de celule T activate. Celulele T care sunt administrate pacientului pot fi preluate de la pacient și activate conform descrierii de mai sus (adică sunt celule T autologe). Ca alternativă, celulele T nu se preiau de la pacient, ci de la alt individ. Desigur, este de preferat ca sursa să fie un individ sănătos. Prin „individ sănătos”, inventatorii înțeleg că individul are o stare generală de sănătate bună, de preferat un sistem imunitar puternic și, mai bine, nu suferă de nicio boală care să poată fi testată sau detectată.

60 *In vivo*, celulele țintă pentru celulele T CD8- pozitive conform prezentei invenții pot fi celule tumorale (care, uneori, exprimă MHC de clasă II) și/sau celulele stromale care înconjură tumora (celule tumorale) (care, uneori, pot și ele exprima MHC de clasă II; (Dengjel et al., 2006)).

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

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

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

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

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

Toate moleculele din această invenție, adică peptida, acidul nucleic, anticorpus, vectorul de exprimare, celula T activată, receptorul celulei T sau acidul nucleic care îl codifică sunt utile pentru tratamentul unor afecțiuni caracterizate de celule care evită un răspuns imunitar. În consecință, orice moleculă din prezenta invenție poate fi utilizată ca medicament sau pentru fabricarea unui medicament. Molecula poate fi utilizată ca atare sau combinată cu altă(e) moleculă(e) din invenție sau cu o moleculă/molecule cunoscută(e).

Prezenta invenție mai include un kit care cuprinde:

(a) un recipient conținând o compoziție farmaceutică conform descoperirii de mai sus, în soluție sau în formă liofilizată;

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

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

Trusa poate conține suplimentar și una sau mai multe din următoarele: (iii) soluție tampon, (iv) dizolvant, (v) filtru, (vi) ac sau (v) seringă. Recipientul este, preferabil, o sticlă, o fiolă, o seringă sau o eprubetă, și poate fi un recipient reutilizabil. Compusul farmacologic este, preferabil, liofilizat.

Trusele din prezentul brevet vor conține, preferabil, formula liofilizată care face obiectul prezentului brevet într-un recipient adecvat și instrucțiunile pentru reconstituirea și/sau utilizarea acesteia. Recipientele adecvate includ, de exemplu, sticle, fiole (de exemplu fiole dublu compartimentate), seringi (cum ar fi seringile dublu-compartimentate) și eprubete. Recipientul poate fi construit dintr-o varietate de materiale, de exemplu sticlă sau plastic. Preferabil, trusa și/sau recipientul conțin instrucțiuni privind (sau asociate cu) recipientul, care prezintă instrucțiunile de reconstituire și/sau administrare. De exemplu, eticheta poate indica dacă formula liofilizată trebuie reconstituită la o concentrație a peptidelor descrisă anterior. În plus eticheta poate indica dacă formula este utilizabilă sau destinată pentru administrarea subcutanată.

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

La amestecarea dizolvantului cu formula liofilizată, concentrația finală de peptide în formula reconstituită este preferabil de cel puțin 0,15 mg/ml/peptidă (=75 ?g) și preferabil nu depășește 3 mg/ml/peptidă (=1500 ?g). În plus trusa poate include și alte materiale necesare din punct de vedere comercial și al utilizării, inclusiv alte soluții tampon, alți dizolvanți, filtre, ace, seringi și pliante cu instrucțiuni de utilizare.

Trusele din prezentul brevet pot prezenta un singur recipient care conține formula compusului farmacologic conform cu prezentul brevet, cu sau fără alte componente (de exemplu alți compuși sau alte formule farmacologice ale acestor alți compuși) sau pot prezenta câte un recipient distinct pentru fiecare compus.

Preferabil, trusele din invenție includ o formă de condiționare care face obiectul brevetului ambalată pentru utilizarea în combinație cu coadministrarea cu un al doilea compus (cum ar fi adjuvanții (de exemplu GM-CSF, agent chimioterapeutic, produs natural, hormon sau antagonist, agent antiangiogenetic sau inhibitor de angiogeneză, agent inductor de apoptoză sau chelator) sau cu

un compus farmacologic al acestora. Componentele trusei pot fi pre-amestecate sau fiecare componentă poate fi într-un recipient separat, distinct, înainte de administrarea către pacient. Componentele trusei se pot furniza în una sau mai multe soluții lichide, preferabil soluții apoase, și în mod ideal ca soluții apoase sterile. Componentele trusei pot fi furnizate de asemenea și în stare solidă, care se poate converti în stare lichidă prin adăugarea solvenților adecvați, care se vor furniza preferabil într-un recipient distinct.

Recipientul unei truse terapeutice poate fi fiolă, eprubetă, flacon, sticlă, seringă sau orice altă formă de depozitare a unui solid sau lichid. De obicei, dacă este vorba de mai mult de un singur component, trusa va include și o a doua fiolă sau un alt recipient, care permite dozarea separată. Trusa poate include și un alt recipient pentru un lichid farmacologic acceptabil. Preferabil, trusa terapeutică va include și un sistem (de exemplu unul sau mai multe ace, seringi, picurătoare pentru ochi, pipete etc.) care permit administrarea agenților care fac obiectul invenției și care intră în componența trusei.

Formula prezentă este una adecvată pentru administrarea peptidelor pe o cale de administrare acceptabilă, cum ar fi orală (enterală), nazală, oftalmică, subcutanată, intradermică, intramusculară, intravenoasă sau transdermică. Preferabil, administrarea va fi subcutanată și, cel mai preferabil, intradermică. Administrarea se poate face prin injectomat.

Deoarece peptidele din invenție sunt izolate din CRC, medicamentul din invenție este folosit, de preferință, pentru tratarea CRC.

Pe lângă utilitatea lor în tratamentul cancerului, peptidele care fac obiectul prezentei invenții sunt utile și în scop diagnostic. Deoarece peptidele au fost generate din celule de CRC și deoarece s-a stabilit că aceste peptide nu sunt prezente sau sunt prezente la niveluri scăzute în țesuturile normale, aceste peptide se pot folosi pentru a diagnostica prezența unui cancer.

Prezența peptidelor revendicate în biopsii tisulare de probe de sânge poate ajuta anatomopatologul în diagnosticul cancerului. Detectarea anumitor peptide prin intermediul anticorpilor, spectrometriei de masă sau a altor metode cunoscute în domeniu poate informa anatomopatologul că proba de țesut este malignă sau inflamată sau, în general, patologică sau poate fi utilizată ca biomarker pentru CRC. Prezența grupurilor de peptide poate permite clasificarea sau subclasificarea țesuturilor bolnave.

Detectarea peptidelor în proba de țesut patologic poate permite decizia referitoare la beneficiile terapiei care implică sistemul imun, în special dacă limfocitele T sunt cunoscute sau prezumate ca implicate în mecanismul de acțiune. Pierderea expresiei MHC este un mecanism bine descris prin care celulele infectate sau maligne eludează supravegherea sistemului imun. Astfel, prezența de peptide arată că acest mecanism nu este exploatat de celulele analizate.

Peptidele descrise în prezentul document se pot utiliza pentru analizarea răspunsului limfocitar contra acestor peptide, cum ar fi răspunsul celulelor T sau răspunsul de tip anticorp contra peptidelor sau peptidelor care formează complexe cu moleculele MHC. Aceste răspunsuri limfocitare se pot folosi ca markeri de prognostic pentru decizii asupra următoarelor etape terapeutice. Aceste răspunsuri pot fi folosite și ca markeri de răspuns surrogat în abordări imunoterapeutice care vizează inducerea de răspunsuri limfocitare prin diferite mijloace, de exemplu vaccinare cu proteine, acizi nucleici, materiale autologe, transfer adoptiv de limfocite. În configurațiile de terapie genică, răspunsurile limfocitare contra peptidelor se pot considera și în evaluarea efectelor secundare. Urmărirea răspunsurilor limfocitare poate fi un instrument valoros pentru examinările de control în cazul terapiei de transplant, de exemplu pentru identificarea bolilor grefă-contra-gazdă și gazdă-contra-grefă.

## FIGURI

Figurile 1–M arată supraprezentarea unor diverse peptide în țesuturi normale (barele albe) și în CRC (barele negre). Figura 1A: Simboluri gene: ZNF679, ZNF716, SAPCD2, Peptidă: ALIKQLFEA (SEQ ID NO: 1), Țesuturi de la stânga la dreapta: 1 țesut adipos, 3 glande suprarenale, 6 artere, 3 măduve osoase, 7 creiere, 3 sani, 1 nerv, 1 ovar, 8 esofage, 2 vezici biliare, 5 inimi, 16 rinichi, 21 ficăți, 46 plămâni, 3 ganglioni limfatici, 4 probe de leucocite, 3 ovare, 7 pancreasuri, 4 nervi periferici, 1 peritoneu, 1 glandă hipofizară, 2 placentă, 3 pleure, 1 prostată, 2 glande salvare, 4 mușchi scheletici, 4 piei, 2 intestine subțiri, 4 spline, 7 stomacuri, 4 testicule, 2 timusuri, 3 glande tiroide, 1 trahee, 1 ureteră, 3 vezici urinare, 2 utere, 2 vene, 13 colonuri, 6 recturi, 24 CRC. Peptida a fost detectată suplimentar pe 9/99 cancere colorectale, 2/28 cancere cerebrale, 4/20 cancere ovariene, 1/45 cancere de stomac, 1/33 cancere de prostată și 2/15 cancere esofagiene (nereprezentate). Figura 1B: Simboluri gene: BRCA2, Peptidă: KQFEGTVEI (SEQ ID NO: 138), Țesuturi de la stânga la dreapta: 1 țesut adipos, 3 glande suprarenale, 6 artere, 3 măduve osoase, 7 creiere, 3 sani, 1 nerv, 1 ovar, 8 esofage, 2 vezici biliare, 5 inimi, 16 rinichi, 21 ficăți, 46 plămâni, 3 ganglioni limfatici, 4 probe de leucocite, 3 ovare, 7 pancreasuri, 4 nervi periferici, 1 peritoneu, 1 glandă hipofizară, 2 placentă, 3 pleure, 1 prostată, 2 glande salvare, 4 mușchi scheletici, 4 piei, 2 intestine subțiri, 4 spline, 7 stomacuri, 4

testicule, 2 timusuri, 3 glande tiroide, 1 trahee, 1 ureteră, 3 vezici urinare, 2 utere, 2 vene, 13 colonuri, 6 recturi, 24 CRC. Peptida a fost detectată suplimentar pe 1/15 cancere esofagiene, 1/28 cancere cerebrale, 1/45 cancere de stomac și 3/91 cancere pulmonare (nereprezentate). Figura 1C: Simboluri gene: IL8, Peptidă: KLAVALLAA (SEQ ID NO: 210), Țesuturi de la stânga la dreapta: 1 țesut adipos, 3 glande suprarenale, 6 artere, 3 măduve osoase, 7 creiere, 3 sâni, 1 nerv, 1 ovar, 8 esofage, 2 vezici biliare, 5 inimi, 16 rinichi, 21 ficăți, 46 plămâni, 3 ganglioni limfatici, 4 probe de leucocite, 3 ovare, 7 pancreasuri, 4 nervi periferici, 1 peritoneu, 1 glandă hipofizară, 2 placent, 3 pleure, 1 prostată, 2 glande salivare, 4 mușchi scheletici, 4 piei, 2 intestine subțiri, 4 spline, 7 stomacuri, 4 testicule, 2 timusuri, 3 glande tiroide, 1 trahee, 1 ureteră, 3 vezici urinare, 2 utere, 2 vene, 13 colonuri, 6 recturi, 24 CRC. Peptida a fost detectată suplimentar pe 14/99 cancere pulmonare, 1/18 cancere renale, 2/28 cancere cerebrale, 2/16 cancere hepatice, 1/20 cancere ovariene, 1/45 cancere de stomac și 3/15 cancere esofagiene (nereprezentate). Figura 1D) Simboluri gene: TMEM222, Peptidă: LLYGKYVSV (SEQ ID NO: 31) Țesuturi de la stânga la dreapta: 3 linii celulare pancreatice, 3 linii celulare cutanate, 1 linie celulară leucocitară, 0 țesuturi normale, 28 țesuturi canceroase (2 cancere cerebrale, 1 cancer de glandă mamară, 1 cancer de colon, 1 cancer esofagian, 2 cancere renale, 1 leucemie, 5 cancere hepatice, 7 cancere pulmonare, 5 cancere ovariene, 1 cancer prostatic, 2 cancere rectale). Panelul de țesuturi normale testat a fost același ca în Figura 1A-C. Discrepanțele cu privire la lista tipurilor de tumori între Figura 1D și Tabelul 2 s-ar putea datora criteriilor de selecție mai stricte aplicate în Tabelul 2. (Pentru detalii, consultați Tabelul 24.) Figura 1D arată toate probele cu prezentare detectabilă a peptidei Y, indiferent de parametrii supraprezentării și de verificarea tehnică a calității probelor. Figura 1E: Simboluri gene: ZNF679, ZNF716, SAPCD2, Peptidă: ALIKQLFEA (SEQ ID NO: 1), Țesuturi de la stânga la dreapta: 7 linii celulare canceroase, 1 cultură de celule canceroase primare, 58 țesuturi canceroase (5 cancere cerebrale, 1 cancer de glandă mamară, 9 cancere de colon, 1 cancer colorectal, 3 cancere esofagiene, 1 cancer de vezică biliară, 2 cancere leucemice leucocitare, 15 cancere pulmonare, 2 cancere de ganglioni limfatici, 1 cancer de celule mieloid, 5 cancere ovariene, 1 cancer de prostată, 4 cancere rectale, 1 cancer de piele, 2 cancere de stomac, 2 cancere de vezică urinară, 3 cancere uterine). Panelul de țesuturi normale testat a fost același ca în Figura 1A-C. Figura 1F: F) Simboluri gene: PLAGL2, Peptidă: FLAELPGSLSL (SEQ ID NO: 6), Țesuturi de la stânga la dreapta: 8 linii de celule canceroase, 1 cultură de celule canceroase primare, 2 țesuturi normale (1 ganglion limfatic, 1 splină), 57 țesuturi canceroase (1 cancer de măduvă osoasă, 1 cancer de glandă mamară, 1 cancer de cec, 5 cancere de colon, 2 cancere esofagiene, 1 cancer de vezică biliară, 3 cancere leucemice leucocitare, 2 cancere hepatice, 13 cancere pulmonare, 8 cancere de ganglioni limfatici, 1 cancer de celule mieloid, 9 cancere ovariene, 2 cancere rectale, 1 cancer de piele, 1 cancer de stomac, 4 cancere de vezică urinară, 2 cancere uterine). Panelul de țesuturi normale testat a fost același ca în Figura 1A-C. Figura 1G: Simboluri gene: CYP2W1, Peptidă: FLDANGHFV (SEQ ID NO: 23), Țesuturi de la stânga la dreapta: 1 cultură de celule canceroase primare, 3 țesuturi normale (3 placent), 12 țesuturi canceroase (5 cancere de colon, 1 cancer esofagian, 1 cancer de vezică biliară, 2 cancere de rect, 3 cancere de stomac). Panelul de țesuturi normale testat a fost același ca în Figura 1A-C. Figura 1H: Simboluri gene: CYP2W1, Peptidă: GLIDEVMVL (SEQ ID NO: 22), Țesuturi de la stânga la dreapta: 1 țesut normal (1 stomac), 6 țesuturi canceroase (3 cancere de colon, 1 cancer de vezică biliară, 2 cancere rectale). Panelul de țesuturi normale testat a fost același ca în Figura 1A-C. Figura 1I: Simboluri gene: AXIN2, Peptidă: ILDDHLRSV (SEQ ID NO: 9), Țesuturi de la stânga la dreapta: 5 țesuturi canceroase (1 cancer de cec, 1 cancer de colon, 1 cancer pulmonar, 2 cancere de rect). Panelul de țesuturi normale testat a fost același ca în Figura 1A-C. Figura 1J: Simboluri gene: RAD54B, Peptidă: KLLAVIHEL (SEQ ID NO: 152), Țesuturi de la stânga la dreapta: 3 linii celulare, 2 țesuturi normale (1 ganglion limfatic, 1 splină), 34 țesuturi canceroase (1 cancer de glandă mamară, 7 cancere de colon, 1 cancer de esofag, 1 cancer de vezică biliară, 1 cancer renal, 8 cancere pulmonare, 4 cancere de ganglioni limfatici, 1 cancer de celule mieloid, 4 cancere ovariene, 1 cancer pancreatic, 1 cancer de rect, 3 cancere de piele, 1 cancer de vezică urinară). Panelul de țesuturi normale testat a fost același ca în Figura 1A-C. Figura 1K: Simboluri gene: ECT2, Peptidă: SLVQRVETI (SEQ ID NO: 142), Țesuturi de la stânga la dreapta: 5 linii celulare, 1 cultură primară, 47 țesuturi canceroase (2 cancere de cale biliară, 2 cancere de glandă mamară, 1 cancer de cec, 7 cancere de colon, 3 cancere esofagiene, 3 cancere de vezică biliară, 1 cancer renal, 2 cancere hepatice, 10 cancere pulmonare, 2 cancere de ganglioni limfatici, 4 cancere ovariene, 1 cancer de pancreas, 2 cancere de rect, 2 cancere de stomac, 2 cancere de piele, 1 cancer de vezică urinară, 2 cancere uterine). Panelul de țesuturi normale testat a fost același ca în Figura 1A-C. Figura 1L: Simboluri gene: MMP12, Peptidă: KIQEMQHFL (SEQ ID NO: 192), Țesuturi de la stânga la dreapta: 1 cultură primară, 44 țesuturi canceroase (5 cancere de colon, 1 cancer esofagian, 1 cancer de vezică biliară, 1 cancer de cap și gât, 30 cancere pulmonare, 1 cancer de ganglioni limfatici, 1 cancer rectal, 1 cancer de stomac, 1 cancer testicular, 1 cancer de vezică urinară, 1 cancer uterin). Panelul de țesuturi normale testat a fost același ca în Figura 1A-C. Figura 1M:

Simboluri gene: COL6A3, Peptidă: FLLDGSANV (SEQ ID NO: 212), Țesuturi de la stânga la dreapta: 3 linii celulare, 2 țesuturi normale (1 placentă, 1 splină), 146 țesuturi canceroase (4 cancere de cale biliară, 13 cancere de glandă mamară, 1 cancer de cec, 8 cancere de colon, 1 cancer colorectal, 6 cancere esofagiene, 5 cancere de vezică biliară, 5 cancere de cap și gât, 2 cancere renale, 1 cancer hepatic, 62 cancere pulmonare, 2 cancere de ganglioni limfatici, 9 cancere ovariene, 7 cancere de pancreas, 3 cancere de rect, 4 cancere de piele, 5 cancere de stomac, 5 cancere de vezică urinară, 3

Panelul de țesuturi normale testat a fost același ca în Figura 1A-C.

Figurile 2A-C arată exemple de profiluri de exprimare (exprimare relativă comparativ cu colon și rect normale) ale genelor-sursă din prezenta invenție care sunt foarte supraexprimate sau exprimate

exclusiv în CRC într-un panel de țesuturi normale (bare albe) și 10 probe de CRC (bare negre). Țesuturi de la stânga la dreapta: glandă suprarenală, arteră, măduvă osoasă, creier (întreg), sân, colon, esofag, inimă, rinichi (triplicat), leucocite, ficat, plămâni, ganglion limfatic, ovar, pancreas, placentă, prostată, glandă salivară, mușchi scheletic, piele, intestin subțire, splină, stomac, testicul, timus, glandă tiroidă, vezică urinară, col uterin, uter, venă, 3 probe de colon normal, 10 probe de CRC.

Figura 2A, CCNB1; Figura 2B, CDK1; Figura 2C, CHMP5. Figura 2D arată exemple de profiluri de exprimare (exprimare relativă comparativ cu colon și rect normale) ale genelor-sursă din prezenta invenție care sunt foarte supraexprimate sau exprimate exclusiv în CRC într-un panel de țesuturi normale (bare albe) și 20 probe de CRC (bare negre). Țesuturi de la stânga la dreapta: 6 artere, 2 celule sanguine, 2 creiere, 1 inimă, 2 ficiți, 3 plămâni, 2 vene, 1 țesut adipos, 1 glandă suprarenală, 5 măduve osoase, 1 cartilaj, 1 colon, 1 esofag, 2 ochi, 2 vezici biliare, 2 glande salivare, 1 rinichi, 6 ganglioni limfatici, 4 pancreasuri, 2 nervi periferici, 2 glande pituitare, 1 rect, 2 mușchi scheletici, 1 piele, 1 intestin subțire, 1 splină, 1 stomac, 1 glandă tiroidă, 7 trahei, 1 vezică urinară, 1 sân, 5 ovare, 5 placentă, 1 prostată, 1 testicul, 1 timus, 1 uter, 20 probe de CRC. Figura 2D: ECT2.

Figura 3 arată exemple de date de imunogenitate: rezultate ale citometriei în flux după colorarea multimerică specifică peptidelor.

Figurile 4A-C arată exemple de rezultate ale răspunsurilor celulelor T CD8+ specifice peptidelor *in vitro* ale unui donator de HLA-A\*02+ sănătos. Celulele T CD8+ au fost amorsate folosindu-se APC-uri artificiale acoperite cu mAb anti-CD28 și HLA-A\*02 în complex cu peptida SEQ ID NO: 22 (A, panoul din stanga), peptida SEQ ID NO: 9 (B, panoul din stanga) sau, respectiv, peptida SEQ ID NO: 142 (C, panoul din stanga). După trei cicluri de stimulare, detectarea celulelor reactive la peptide s-a efectuat prin colorare multimerică 2D cu A\*02/ SEQ ID NO: 22 (A) A\*02/SEQ ID NO: 9 (B) sau A\*02/SEQ ID NO: 142 (C). Panourile din stanga (A, B și C) arată colorarea de control a celulelor stimulate cu complexe A\*02/peptidice irelevante. Celulele singlet viabile au fost selectate prin gating pentru limfocite CD8+. Porțile booleene au ajutat la excluderea evenimentelor fals pozitive detectate cu multimeri specifici pentru diferite peptide. Sunt indicate frecvențele celulelor multimer+ specifice între limfocitele CD8+.

#### EXEMPLE

##### EXEMPLUL 1

##### Identificarea și cuantificarea peptidelor asociate tumorii prezentate pe suprafața celulară

##### Probe de țesut

Țesuturile tumorale de la pacienți au fost obținute de la Spitalul Universitar din Tübingen.

Țesuturile normale au fost obținute de la Asterand, Detroit, SUA și Royston, Herts, Regatul Unit; Bio-Options Inc., CA, SUA; BioServe, Beltsville, MD, SUA; Capital BioScience Inc., Rockville, MD, SUA; Geneticist Inc., Glendale, CA, SUA; Tissue Solutions Ltd, Glasgow, Scotland, Regatul Unit; Spitalul Universitar din Geneva; Spitalul Universitar din Heidelberg; Universitatea de Medicină Prefecturală din Kyoto (KPUM); Spitalul Universitar din Munchen; ProteoGenex Inc., Culver City, CA, SUA; Spitalul Universitar din Tübingen. Consimțămintele informate scrise ale pacienților au fost obținute înainte de intervențiile chirurgicale sau autopsii. Țesuturile au fost congelate rapid imediat după excizare și stocate până la izolarea TUMAP la -70°C sau temperaturi mai joase.

##### Izolarea peptidelor HLA din probe de țesut

Seturile de peptide HLA din probe de țesut înghețate prin șoc au fost obținute prin precipitare imună din țesuturi solide conform unui protocol ușor modificat (Falk et al., 1991; Seeger et al., 1999) folosindu-se anticorpii HLA-A\*02-specific BB7.2, anticorpii HLA-A, -B, -C-specific W6/32, sefaroză CNBr-activată, tratament cu acid și ultrafiltrare.

##### Analize prin spectrometrie de masă

Seturile de peptide HLA obținute au fost separate în funcție de hidrofobie prin cromatografie în fază inversă (sistem nanoAcquity UPLC, Waters), iar peptidele eluate au fost analizate în spectrometre de masă hibride LTQ-velos și cu fuziune (ThermoElectron) echipate cu o sursă ESI. Seturile de peptide au fost încărcate direct în coloana de analiză microcapilară cu siliciu infuzat (75 μm i.d. x 250 mm) prevăzută cu material în fază inversă C18, de 1,7 μm (Waters) cu aplicarea unui

debit de 400 nl pe minut. Apoi, peptidele au fost separate cu ajutorul unui gradient binar de 180 minute în două trepte, de la 10% la 33% B la un debit de 300 nl pe minut. Gradientul a fost compus din solvent A (0,1% acid formic în apă) și solvent B (0,1% acid formic în acetonitril). Un capilar din sticlă aurită (PicoTip, New Objective) a fost utilizat pentru introducerea în sursa nanoESI. Spectrometrele de masă LTQ-Orbitrap au fost operate în modul dependent de date folosindu-se o strategie TOP5. Pe scurt, un ciclu de scanare a fost inițiat cu o scanare completă de mare precizie masică în orbitrap (R = 30.000), urmată de scanări MS/MS tot în orbitrap (R = 7500) pe cele mai abundente 5 ioni precursori cu excluderea dinamică a ionilor selectați anterior. Spectrul de masă tandem a fost interpretat de SEQUEST și alte controale manuale. Secvența peptidică identificată a fost asigurată prin compararea modelului de fragmentare a peptidei naturale generat cu modelul de fragmentare a peptidei sintetice de referință, cu secvență identică.

Cuantificarea LC-MS relativă fără etichete a fost efectuată prin numărarea ionilor, adică prin extracție și analiză a caracteristicilor LC-MS (Mueller et al., 2007). Metoda presupune că zona de semnal LC-MS a peptidei se corelează cu abundența sa în probă. Caracteristicile extrase au fost prelucrate APOI prin deconvoluția de stare a încărcării și alinierea timpului de retenție (Mueller et al., 2008; Sturm et al., 2008). În final, toate caracteristicile LC-MS au fost referențiate încrucișat cu rezultatele identificării secvenței pentru a combina datele cantitative ale diferitelor probe și țesuturi cu profilurile de prezentare ale peptidelor. Datele cantitative au fost normalizate pe două niveluri în funcție de tendința centrală pentru a ține cont de variațiile în cadrul replicilor tehnice și biologice. Astfel, fiecare peptidă identificată poate fi asociată cu date cantitative care permit cuantificarea relativă între probe și țesuturi. În plus, toate datele cantitative obținute pentru candidații peptidici au fost inspectate manual pentru a se asigura consecvența datelor și a se verifica acuratețea analizei automate. Pentru fiecare peptidă a fost calculat un profil de prezentare care arată prezentarea medie a probei, precum și variațiile replicilor. Profilurile juxtapun probe de CRC cu o referință de probe de țesut normal. Profilurile de prezentare ale peptidelor exemplificate supraprezentate sunt prezentate în Figura 1. Scorurile de prezentare pentru peptida din invenție sunt prezentate în Tabelul 5.

Tabelul 5: Scoruri de prezentare. Tabelul prezintă peptida care este extrem de supraprezentată pe tumori în comparație cu un panel de țesuturi normale (+++), foarte supraprezentate pe tumori în comparație cu un panou de țesuturi normale (++) sau supraprezentate pe tumori în comparație cu un panel de țesuturi normale (+).

SEQ NO:	ID	Secvență	Prezentare a peptidei
22		GLIDEVMVL	+++

## EXEMPLUL 2

### Profilarea exprimării genelor care codifică peptidele din invenție

Supraprezentarea sau prezentarea specifică a unei peptide pe celule tumorale în comparație cu celule normale este suficientă pentru utilitatea sa în imunoterapie, iar unele peptide sunt specifice tumorii în pofida proteinei-sursă care apare și în țesuturile normale. Totuși, profilarea exprimării ARNm adaugă un nivel suplimentar de siguranță în selectarea țintelor peptidice pentru imunoterapie. În special pentru opțiunile terapeutice cu riscuri mari de siguranță, cum ar fi TCR-urile maturizate în funcție de afinitate, peptida-țintă ideală va fi derivată dintr-o proteină care este unică pentru tumoare și care nu se găsește pe țesuturi normale.

### Surse de ARN și pregătirea acestora

Eșantioanele de țesut prelevate chirurgical au fost furnizate așa cum este indicat mai sus (a se vedea Exemplul 1) după obținerea consimțământului informat scris de la fiecare pacient. Probele de țesut tumoral au fost înghețate instantaneu imediat după intervenția chirurgicală și au fost ulterior omogenizate cu mojar și pistil sub azot lichid. ARN-ul total a fost preparat din aceste probe, utilizandu-se reactiv TRI (Ambion, Darmstadt, Germania), urmat de o curățare cu RNeasy (QIAGEN, Hilden, Germania); ambele metode au fost executate conform protocolului producătorului.

ARN-ul total din țesuturi umane sănătoase a fost obținut comercial (Ambion, Huntingdon, Regatul Unit; Clontech, Heidelberg, Germania; Stratagene, Amsterdam, Țările de Jos; BioChain, Hayward, CA, SUA). ARN-ul de la mai mulți indivizi (între 2 și 123 indivizi) a fost combinat astfel încât ARN-ul fiecărui individ să fie ponderat în mod egal.

Calitatea și cantitatea tuturor probelor de ARN au fost evaluate printr-un bioanalizor Agilent 2100 (Agilent, Waldbronn, Germania) cu trusă RNA 6000 Pico LabChip (Agilent).

### Experimente în micromatrice

Analiza expresiei genomului tuturor probelor de ARN din țesut tumoral și normal a fost efectuată cu micromatrice de oligonucleotide Affymetrix Human Genome (HG) U133A sau HG-U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, SUA). Toate etapele au fost urmate în conformitate cu

5 manualul Affymetrix. Pe scurt, ADNc cu dublu-helix a fost sintetizat din 5–8 µg ARN total, folosindu-se SuperScript RTII (Invitrogen) și primerul oligo-dT-T7 (MWG Biotech, Ebersberg, Germania) conform descoperirii din manual. Transcrierea *in vitro* a fost efectuată cu o trusă BioArray High Yield RNA Transcript Labelling (ENZO Diagnostics, Inc., Farmingdale, NY, SUA) pentru matricele U133A sau cu o trusă GeneChip IVT Labelling (Affymetrix) pentru matricele U133 Plus 2.0, urmată de fragmentarea ARNc, hibridizare și colorare cu streptavidină-ficoeritrină și anticorp anti-streptavidină biotinitat (Molecular Probes, Leiden, Țările de Jos). Imaginile au fost scanate cu Agilent 2500A GeneArray Scanner (U133A) sau cu Affymetrix Gene-Chip Scanner 3000 (U133 Plus 2.0), iar datele au fost analizate cu software-ul GCOS (Affymetrix), folosindu-se setările implicite pentru toți parametrii. Pentru normalizare au fost folosite 100 gene auxiliare furnizate de Affymetrix. Valorile exprimărilor relative au fost calculate pe baza rapoartelor jurnalelor de semnal furnizate de software, iar proba de rinichi normal a fost stabilită arbitrar la 1,0. Exemplele de profiluri de exprimare ale genelor-sursă din prezenta invenție care sunt puternic supraexprimate sau exprimate exclusiv în CRC sunt prezentate în Figura 2. Scorurile de exprimare pentru alte exemple de gene sunt prezentate în Tabelul 6.

10 Tabelul 6: Scoruri de exprimare. Tabelul enumeră peptide din gene necorelate cu invenția care sunt extrem de supraexprimate pe tumori în comparație cu un panel de țesuturi normale (+++), foarte supraexprimate pe tumori în comparație cu un panou de țesuturi normale (++) sau supraexprimate pe tumori în comparație cu un panel de țesuturi normale (+).

SEQ NO:	ID	Nume genă	Secvență	Exprimare genă
2		ATP10B	ALLPRYFFL	+++
5		SLC12A1,SLC12A2,SLC12A3	WLFDDGGLTL	+++
6		PLAGL2	FLAELPGSLSL	+++
7		MUC2	YLTRHLAVL	+
8		HSPD1	ALMLQGVDLL	+
13		SMC2	FLLAEDTKV	+++
16		KLK10	VLVDQSWVL	+
17		SLC12A2	ALAAARVEL	+++
19		MYO10	RLYTKLLNEA	+++
27		CHMP5	LLADEDSSYL	++
29		AP3D1	QMLDVAIRV	+
35		OLFM4	KLLDLTVRI	+
36		LARP4B	GLLESPTSIFNFTA	+
39		CDX2	GLNGGSPAAA	++
40		SERPINB5	ALSNVIHKV	+
41		HEPH	ILDDSFKLL	++
42		HEPH	SILDDSFKL	++
46		PKP3	GLDDRYSLV	+
47		ERBB3	KLYERCEVV	+
53		TBC1D8B	FLLGSEIKL	+
55		PMS1	QIITSVVSV	++
57		PKP2	NLLEKENYL	++
60		AGTPBP1	VLDEDEPRFL	+
63		HEATR2	KLFSILSTV	++
64		SOX8,SOX9,SOX10	KTLGKLWRL	++
67		SMARCA4	SLNDLEKDVMLL	++
68		PTPRO	SILQFVHMV	+
73		APIP	YLFDAVSM	+
74		ARHGAP8,PRR5-ARHGAP8,PRR5	YLMGFLHAV	+

SEQ NO:	ID	Nume genă	Secvență	Exprimare genă
75		CFTR	EMIENIQSV	+++
77		DDX5	SLLKRDFGA	+
79		SRSF11	SLAADQLLKL	++
81		TGIF1	ALLSQQTHL	+
84		DSP	SMVEDITGLRL	+
86		MUC13	KVFP GKISV	+++
89		ITGA6	SLIEYEFRV	++
90		EBNA1BP2	GLLKPGLNVVL	++
92		PARN	WIDDTSAFV	+
98		ATP13A3	AMNGKSFSV	+++
104		MUC2	ILLTIKDDTIYL	+
112		GALNT7	KLQVLIYL	++
113		KCNN4	ILYDLQQNL	+
123		RRM1	KTLERSYLL	+++
124		AURKB	RVLPPSALQSV	++
126		CCNB1,CCNB2	TLAKYLMEL	+++
129		CNOT1	VLIDVLKEL	+
130		PRRC2C	GLGGSQIDTHL	++
132		NOL11	ALLNAILHSA	++
134		EIF2S3,LOC255308	GVAGGSILKGV	+
135		CENPE	KLQEEIPVL	+
138		BRCA2	KQFEGTVEI	++
139		NCAPG	VLLNEILEQV	+++
140		NCAPG	LLNEILEQV	+++
142		ECT2	SLVQRVETI	++
144		ZSWIM1	LLNDRIWLA	++
147		KDM5C	TLTELRAFL	+
148		PDXDC1	RLENMTEVV	+
152		RAD54B	KLLAVIHEL	+
156		TOP2A	SLMMTIINL	+++
157		URB1	SLIERDLKL	+
160		SYNJ2	KLLEFDQLQL	+
161		TRAIP	FLKNELDNV	+
166		CDC6	GLLEARGILGL	+
171		HMGXB4	RLQETEGMVAV	+
172		COPG1	LLLDTVTMQV	+
180		GPD2	NLLEIAPHL	+
183		AGK	TLQEVVTGV	++
184		PRKDC	SLLDENNVSSYL	+
187		CNOT1	GLHNVVYGI	+
188		ZSWIM1	FLVDGPRVQL	++
190		NCAPD2	AMAEMVLQV	+
191		CDK5RAP2	QLFSEIHNL	+

SEQ NO:	ID	Nume genă	Secvență	Exprimare genă
192		MMP12	KIQEMQHFL	++
194		RAD54B	SLYKGLLSV	+
197		ZNF451	SLFGQDVKAV	+
198		CEACAM6	VLYGPDVPTI	++
202		FANCA	GLAALAVHL	++
204		GOLGA4	KLLDLETERILL	+
205		RPGRIP1L	RLHDENILL	+
206		EFR3A	RIAGIRGIQGV	+
208		NAA35	RLIDRIKTV	+
215		CENPE	KLQEKIQEL	+
219		MUC2	FLDEKGRCV	+
223		CDK1	VLMQDSRLYL	+++
225		TOP2A	YLYGQTTTYL	+++
228		HNRNPH1,HNRNPH2	SMSGYDQVL	+++
229		DDX11,DDX12P,LOC642846	YLLEKFVAV	+
230		WNT5A	AMSSKFFLV	+
232		LAMC2	RLLDSVSRL	++
233		LAMC2	RLDDLKMTV	++
235		TCF20	LLHEENFSV	+
236		CENPF	KMSELQTYV	++
239		KIF15	QLIEKNWLL	+++
240		RCN1	VLAPRVLRA	++
241		CCNB1	ILIDWLVQV	+++
250		EEF2	ALCEENMRGV	+
257		CNOT1	SLADFMQEV	+

## EXEMPLUL 3

Imunogenitatea *in vitro* pentru peptide prezentate MHC de clasă I

5 Pentru a obține informații cu privire la imunogenitatea TUMAP-urilor din prezenta invenție, inventatorii au efectuat investigații utilizând un test *in vitro* de amorsare a celulelor T pe baza stimulărilor repetate de celule T CD8+ cu celule care prezintă un antigen artificial (aAPC) încărcate cu complexe de peptide/MHC și anticorp anti-CD28. Astfel, inventatorii au putut arăta imunogenitatea pentru 22 TUMAP-uri restricționate de HLA-A\*0201 conform invenției până în prezent, demonstrând că aceste peptide sunt epitopi ai celulelor T împotriva cărora există celule T precursorare CD8+ la oameni (Tabelul 7).

10 Amorsarea *in vitro* a celulelor T CD8+

Pentru a efectua stimulări *in vitro* de către celule prezentatoare de antigen artificiale încărcate cu complex peptidă-MHC (pMHC) și anticorp anti-CD28, inventatorii au izolat mai întâi celule T CD8+ din produse de leucafereză HLA-A\*02 proaspete prin selectare pozitivă utilizând microgranule CD8 (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germania) de la donatori sănătoși, obținute de la University Clinics Mannheim, Germania, după consimțământ informat.

PBMC-urile și limfocitele CD8+ izolate au fost incubate până la utilizare în mediu de celule T (TCM) constând din RPMI-Glutamax (Invitrogen, Karlsruhe, Germania) suplimentat cu ser AB uman inactivat la căldură 10% (PAN-Biotech, Aidenbach, 100 U/ml penicilină/100 μg/ml streptomycină (Cambrex, Köln, Germania), 1 mM piruvat de sodiu (CC Pro, Oberdorla, Germania), 20 μg/ml gentamicină (Cambrex). În această etapă s-au adăugat, de asemenea, la TCM 2,5 ng/ml IL-7 (PromoCell, Heidelberg, Germania) și 10 U/ml IL-2 (Novartis Pharma, Nurnberg, Germania).

25 Generarea granulelor acoperite cu pMHC/anti-CD28, stimularea celulelor T și citirea au fost realizate într-un sistem *in vitro* înalt definit utilizându-se 4 molecule diferite de pMHC pentru fiecare condiție de stimulare și 8 molecule diferite de pMHC pentru fiecare condiție de citire.

Anticorpul purificat costimulator 9.3 anti-uman IG2a CD28 de cobai (Jung et al., 1987) a fost biotinilat chimic folosind sulfo-N-hidroxisuccinimicobiotină în condițiile recomandate de producător (Perbio, Bonn, Germania). Granulele utilizate au fost de particule de polistiren de 5,6 μm acoperite cu streptavidină (Bangs Laboratories, Illinois, SUA).

5 pMHC-ul utilizat pentru stimularea controalelor pozitiv și negativ a fost A\*0201/MLA-001 (peptidă ELAGIGILTV (SEQ ID NO: 266) din Melan-A/MART-1) modificat și, respectiv, A\*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI din DDX5, SEQ ID NO: 267).

800.000 de granule/200 μl au fost acoperite în plăci cu 96 de godeuri în prezența a 4x12,5 ng de biotină-pMHC diferite, au fost spălate și apoi s-au adăugat 600 ng de biotină anti-CD28 într-un volum de 200 μl. Stimulările au fost inițiate în plăci de 96 de godeuri prin coincubare cu 1x10<sup>6</sup> celule T CD8+ cu 2x10<sup>5</sup> perle tapetate spălate în 200 μl TCM suplimentat cu 5 ng/ml IL-12 (PromoCell) pentru 3 zile la 37°C. Jumătate din mediu a fost apoi schimbat cu TCM proaspete suplimentate cu 80 U/ml IL-2, iar incubarea a fost continuată timp de 4 zile la 37°C. Acest ciclu de stimulare s-a efectuat în total de trei ori. Pentru citirea multimerului pMHC folosindu-se 8 molecule pMHC diferite per condiție, a fost utilizată o abordare de codificare combinatorică bidimensională, așa cum a fost descris anterior (Andersen et al., 2012), cu modificări minore care cuprind cuplarea la 5 fluorocromi diferiți. În final, s-au efectuat analize multimerice prin colorarea celulelor cu colorant aproape IR viu/mort (Invitrogen, Karlsruhe, Germania), clonă de anticorp CD1-FITC SK1 (BD, Heidelberg, Germania) și multimeri fluorescenți pMHC. Pentru analiză a fost utilizat un citometru BD LSRII SORP echipat cu lasere și filtre adecvate. Celulele specifice peptidei au fost calculate ca procentaje din totalul celulelor CD8+. Evaluarea analizei multimerice a fost efectuată utilizându-se software-ul FlowJo (Tree Star, Oregon, SUA). Amorsarea *in vitro* a limfocitelor multimer+ CD8+ specifice a fost detectată prin comparație cu stimulări de control negative. Imunogenitatea pentru un antigen dat a fost detectată dacă cel puțin un godeu evaluabil stimulat *in vitro* al unui donor sănătos a fost găsit conținând o anumită linie de celule T CD8+ după stimulare *in vitro* (adică acest godeu conține cel puțin 1% de multimer+ specific între celulele T CD8+ și procentajul celulelor tetramer+ este de cel puțin 10 ori mediana stimulărilor negative).

#### Imunogenitatea *in vitro* pentru peptide CRC

Pentru peptidele HLA de clasă I testate, imunogenitatea *in vitro* se poate demonstra prin generarea de linii de celule T specifice peptidelor. Exemple de rezultate ale citometriei în flux după colorarea cu multimer TUMAP-specific pentru 1 peptidă din descoperire sunt prezentate în Figura 3 împreună cu controalele negative corespunzătoare. Rezultatele pentru peptida din invenție sunt rezumate în Tabelul 7.

Tabelul 7: Date pentru imunogenitatea *in vitro* a peptidei HLA de clasă I din invenție.

35 Rezultatele exemplificative ale experimentelor de imunogenitate *in vitro* efectuate de către solicitant pentru peptidele restricționate HLA-A\*02 din invenție. Sunt indicate rezultatele experimentelor de imunogenitate *in vitro*. Procentajele de godeuri și donatori pozitivi (printre evaluabili) sunt rezumate după cum este indicat; <20% = +; 20% - 49% = ++; 50% - 69% = +++; >= 70% = ++++

SEQ ID NO:	Secvență	Godeuri pozitive [%]
22	GLIDEVMVL	"++"

#### 40 EXEMPLUL 4

##### Sinteza peptidelor

Toate peptidele au fost sintetizate utilizandu-se sinteza standard și bine stabilită de peptide în fază solidă utilizandu-se strategia Fmoc. Identitatea și puritatea fiecărei peptide individuale au fost determinate prin spectrometrie de masă și RP-HPLC analitic. Peptidele au fost obținute sub formă de liofilizați de culoare albă până la albă (sare de trifluoroacetat) cu purități >50%. Toate TUMAP-urile se administrează preferabil ca săruri de trifluoroacetat sau de acetat, fiind posibile și alte săruri.

#### 45 EXEMPLUL 5

##### Teste de legare la MHC

50 Peptidele candidate pentru terapii bazate pe celule T în conformitate cu prezenta invenție au fost testate în continuare în privința capacității lor de legare la MHC (afinitate). Complexele peptidă-MHC individuali au fost produse prin schimb UV-ligand, unde o peptidă sensibilă la UV este scindată la iradiere UV și schimbată cu peptida de interes, așa cum a fost analizată. Doar candidații peptidici care se pot lega și stabiliza în mod eficient moleculele de MHC receptive la peptide împiedică disocierea complexelor MHC. Pentru a determina randamentul reacției de schimb, a fost efectuat un ELISA bazat pe detectarea lanțului ușor (β2m) al complexelor MHC stabilizați. Testul a fost efectuat așa cum este descris cu caracter general în Rodenko et al. (Rodenko et al., 2006).

Plăci de 96 de godeuri MAXISorp (NUNC) au fost acoperite peste noapte cu 2 $\mu$ g/ml streptavidină în PBS la temperatura camerei, au fost spălate de 4 ori și au fost blocate pentru 1 oră la 37°C în 2% BSA care conținea tamponul de blocare. Monomerii HLA-A\*02:01/MLA-001 reasamblați au servit ca standarde, acoperind domeniul 15-500 ng/ml. Monomerii peptidă-MHC ai reacției de schimb UV au fost diluați de 100 de ori în tampon de blocare. Probele au fost incubate timp de 1 oră la 37°C, au fost spălate de patru ori, au fost incubate cu 2  $\mu$ g/ml anti- $\beta$ 2m HRP conjugat timp de 1 oră la 37°C, au fost spălate din nou și au fost detectate cu soluția TMB stopată cu NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Absorbția a fost măsurată la 450 nm. Peptidele candidate care prezintă un randament de schimb mare (preferabil mai mare de 50%, cele mai preferabil mai mare de 75 %) sunt, în general, preferate pentru o generare și producție de anticorpi sau fragmente ale acestora și/sau receptori de celule T sau fragmente ale acestora, deoarece arată suficientă aviditate la molecule de MHC și împiedică disocierea complexelor MHC.

Tabelul 8: Scor de legare MHC clasă I. Legarea peptidei restricționate HLA de clasă I la HLA-A\*02:01 fost clasificată prin randamentul schimbului peptidic:  $\geq 10\%$  = +;  $\geq 20\%$  = ++;  $\geq 50\%$  = +++;  $\geq 75\%$  = ++++; J = fosfoserină

SEQ ID NO:	Secvență	Schimb de peptide
22	GLIDEVMVL	"+++"

#### EXEMPLUL 6

##### Cuantificarea absolută a peptidelor asociate tumorii prezentate pe suprafața celulară

Generarea de lianți, cum ar fi anticorpi și/sau TCR-uri, este un proces laborios, care poate fi realizat numai pentru o serie de ținte selectate. În cazul peptidelor asociate tumorii și specifice tumorii, criteriile de selecție includ, dar nu sunt limitate la exclusivitatea prezentării și la densitatea peptidei prezentate pe suprafața celulei. În plus față de izolarea și cuantificarea relativă a peptidelor așa cum este descris în EXEMPLUL 1, inventatorii au analizat copii absolute de peptide per celulă așa cum este descris în brevetul x. Cuantificarea copiilor de TUMAP-uri per celulă în probe tumorale solide necesită cuantificarea absolută a TUMAP-urilor izolate, a eficacității izolării TUMAP-urilor și a numărului de celule din proba de țesut analizată. O imagine de ansamblu asupra abordării noastre experimentale este dată în Figura 4, iar pașii experimentali sunt descriși mai jos.

##### Cuantificarea peptidelor prin nanoLC-MS/MS

Pentru o cuantificare precisă a peptidelor prin spectrometrie de masă, a fost generată o curbă de calibrare pentru fiecare peptidă utilizându-se metoda standard internă. Standardul intern este o variantă marcată cu dublu izotop a fiecărei peptide, adică, în sinteza TUMAP-urilor, au fost incluși doi aminoacizi marcați cu izotopi. Aceasta diferă de peptidea asociată tumorii doar prin masa sa, însă nu prezintă nicio diferență privind alte proprietăți fizico-chimice (Anderson et al., 2012). Standardul intern a fost îmbogățit la fiecare probă pentru MS și toate semnalele MS au fost normalizate la semnalul MS al standardului intern pentru a se nivela variațiile tehnice potențiale dintre experimentele cu MS.

Curbele de calibrare au fost preparate în cel puțin trei matrice diferite, adică peptide HLA eluează din probe naturale similare cu probele pentru MS de rutină și fiecare preparat a fost măsurat rulari de MS duplicate. Pentru evaluare, semnalele SM au fost normalizate la semnalul standardului intern și o curbă de calibrare a fost calculată prin regresie logistică.

Pentru cuantificarea peptidelor asociate tumorii din probe de țesut, probele respective au fost, de asemenea, îmbogățite cu standardul intern; semnalele MS au fost normalizate la standardul intern și cuantificate utilizându-se curba de calibrare peptidică.

##### Eficacitatea izolării peptidelor/MHC-urilor

În ceea ce privește orice proces de purificare a proteinelor, izolarea proteinelor din probele de țesut este asociată cu o anumită pierdere a proteinei de interes. Pentru a determina eficiența izolării TUMAP-urilor, complexe peptidice/MHC au fost generate pentru toate TUMAP-urile selectate pentru cuantificare absolută. Pentru a putea discrimina complexe peptidice/MHC naturale de cele îmbogățite, s-au utilizat versiuni de TUMAP-uri marcate cu un singur izotop, adică în sinteza TUMAP-urilor a fost inclus un aminoacid marcat izotop. Aceste complexe au fost îmbogățite în lizate de țesut proaspăt preparate, adică în cel mai timpuriu punct posibil al procedurii de izolare a TUMAP-urilor, și apoi au fost capturate precum complexe peptidice/MHC naturale în următoarea purificare de afinitate. Prin urmare, măsurarea recuperării TUMAP-urilor marcate cu un singur izotop permite concluzii cu privire la eficiența izolării TUMAP-urilor naturale individuale.

Eficiența izolării a fost analizată pe un număr redus de probe și a fost comparabilă între aceste probe de țesut. În schimb, eficiența izolării diferă între peptidele individuale. Acest lucru sugerează că eficiența izolării, deși este determinată doar la un număr limitat de probe de țesut, poate

fi extrapolată la orice alt preparat tisular. Cu toate acestea, este necesar să se analizeze fiecare TUMAP individual, deoarece eficiența izolării nu poate fi extrapolată de la o peptidă la altele.

#### Determinarea numărului de celule în țesut solid, congelat

5 Pentru a determina numărul de celule din probele de țesut supuse cuantificării peptidice absolute, inventatorii au aplicat analiza conținutului de ADN. Această metodă este aplicabilă unei mari varietăți de probe de origine diferită și, cel mai important, probelor congelate (Alcoser et al., 2011; Forsey și Chaudhuri, 2009; Silva et al., 2013). În timpul protocolului de izolare peptidică, o probă de țesut este prelucrat la un lizat omogen, din care se prelevează o parte alicotă mică de lizat. Partea alicotă este împărțită în trei părți, din care se izolează ADN-ul (QiaAmp DNA Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germania). Conținutul total de ADN de la fiecare izolare de ADN este cuantificat utilizându-se un test de cuantificare a ADN-ului bazat pe fluorescență (Qubit dsDNA HS Assay Kit, Life Technologies, Darmstadt, Germania) în cel puțin două replicări.

15 Pentru a calcula numărul de celule, a fost generată o curbă ADN standard din părțile alicote de celulele sanguine sănătoase singulare, cu un interval de numere de celule definit. Curba standard este utilizată pentru a calcula conținutul total de celule din conținutul total de ADN de la fiecare izolare de ADN. Numărul mediu total de celule din proba de țesut utilizată pentru izolarea peptidelor este extrapolat luându-se în considerare volumul cunoscut al părților alicote de lizat și volumul total de lizat.

#### Copii de peptide per celulă

20 Cu datele din experimentele menționate mai sus, inventatorii au calculat numărul de copii de TUMAP-uri per celulă prin împărțirea cantității totale de peptide la numărul total de celule din probă, urmată de împărțirea la eficiența izolării. Numerele de copii celulare pentru peptidă sunt arătate în Tabelul 9

25 Tabelul 9: Numere absolute de copii. Tabelul prezintă rezultatele cuantificării peptidice absolute la probe tumorale de NSCLC. Numărul median de copii per celulă este indicat pentru fiecare peptidă: <100 = +; >=100 = ++; >=1.000 = +++; >=10.000 = ++++. Este indicat numărul de probe în care sunt disponibile date de MS evaluabile de înaltă calitate.

SEQ NO:	ID	Cod peptidă	Copii per celulă (valoare mediană)	Număr de probe
22		CYP2W1-001	++	23

### 30 Listă de referință

- Allison, J. P. et al., *Science* 270 (1995): 932-933  
 Andersen, R. S. et al., *Nat.Protoc.* 7 (2012): 891-902  
 Appay, V. et al., *Eur.J Immunol.* 36 (2006): 1805-1814  
 35 Banchereau, J. et al., *Cell* 106 (2001): 271-274  
 Beatty, G. et al., *J Immunol* 166 (2001): 2276-2282  
 Beggs, J. D., *Nature* 275 (1978): 104-109  
 Benjamini, Y. et al., *Journal of the Royal Statistical Society.Series B (Methodological)*, Vol.57 (1995): 289-300  
 40 Boulter, J. M. et al., *Protein Eng* 16 (2003): 707-711  
 Braumuller, H. et al., *Nature* (2013)  
 Brossart, P. et al., *Blood* 90 (1997): 1594-1599  
 Bruckdorfer, T. et al., *Curr.Pharm.Biotechnol.* 5 (2004): 29-43  
 Card, K. F. et al., *Cancer Immunol Immunother.* 53 (2004): 345-357  
 45 Chanock, S. J. et al., *Hum.Immunol.* 65 (2004): 1211-1223  
 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 JE et al., (1995)  
 50 Colombetti, S. et al., *J Immunol.* 176 (2006): 2730-2738  
 Dengjel, J. et al., *Clin Cancer Res* 12 (2006): 4163-4170  
 Denkberg, G. et al., *J Immunol* 171 (2003): 2197-2207  
 Falk, K. et al., *Nature* 351 (1991): 290-296  
 Fong, L. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98 (2001): 8809-8814  
 55 Gabrilovich, D. I. et al., *Nat Med.* 2 (1996): 1096-1103  
 Gattinoni, L. et al., *Nat Rev.Immunol* 6 (2006): 383-393  
 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  
 Green MR et al., 4th, (2012)  
 Greenfield EA, 2nd, (2014)  
 Hwang, M. L. et al., *J Immunol.* 179 (2007): 5829-5838  
 5 Jung, G. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1987): 4611-4615  
 Kibbe AH, rd, (2000)  
 Krieg, A. M., *Nat Rev.Drug Discov.* 5 (2006): 471-484  
 Liddy, N. et al., *Nat Med.* 18 (2012): 980-987  
 Ljunggren, H. G. et al., *J Exp.Med.* 162 (1985): 1745-1759  
 10 Longenecker, B. M. et al., *Ann N.Y.Acad.Sci.* 690 (1993): 276-291  
 Lukas, T. J. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 78 (1981): 2791-2795  
 Lundblad RL, 3rd, (2004)  
 Meziere, C. et al., *J Immunol* 159 (1997): 3230-3237  
 Morgan, R. A. et al., *Science* 314 (2006): 126-129  
 15 Mori, M. et al., *Transplantation* 64 (1997): 1017-1027  
 Mortara, L. et al., *Clin Cancer Res.* 12 (2006): 3435-3443  
 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  
 20 Pinheiro J et al., (2015)  
 Plebanski, M. et al., *Eur.J Immunol* 25 (1995): 1783-1787  
 Porta, C. et al., *Virology* 202 (1994): 949-955  
 Rammensee, H. G. et al., *Immunogenetics* 50 (1999): 213-219  
 Rini, B. I. et al., *Cancer* 107 (2006): 67-74  
 25 Rock, K. L. et al., *Science* 249 (1990): 918-921  
 Rodenko, B. et al., *Nat Protoc.* 1 (2006): 1120-1132  
 Saiki, R. K. et al., *Science* 239 (1988): 487-491  
 Seeger, F. H. et al., *Immunogenetics* 49 (1999): 571-576  
 Sherman F et al., (1986)  
 30 Singh-Jasuja, H. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* 53 (2004): 187-195  
 Small, E. J. et al., *J Clin Oncol.* 24 (2006): 3089-3094  
 Sturm, M. et al., *BMC.Bioinformatics.* 9 (2008): 163  
 Teufel, R. et al., *Cell Mol Life Sci.* 62 (2005): 1755-1762  
 Tran, E. et al., *Science* 344 (2014): 641-645  
 35 Walter, S. et al., *J Immunol* 171 (2003): 4974-4978  
 Walter, S. et al., *Nat Med.* 18 (2012): 1254-1261  
 Willcox, B. E. et al., *Protein Sci.* 8 (1999): 2418-2423  
 Zaremba, S. et al., *Cancer Res.* 57 (1997): 4570-4577  
 Albrecht, M. et al., *FEBS Lett.* 569 (2004): 18-26  
 40 Albuлесcu, R., *Biomark.Med.* 7 (2013): 203  
 Aschauer, H. et al., *Wien.Klin.Wochenschr.* 95 (1983): 785-788  
 Aung, P. P. et al., *Oncogene* 25 (2006): 2546-2557  
 Backen, A. C. et al., *Br.J Cancer* 96 (2007): 1544-1548  
 Bai, J. et al., *PLoS.One.* 8 (2013b): e59772  
 45 Bailey, C. M. et al., *J Cell Physiol* 209 (2006): 617-624  
 Baris, O. et al., *J Clin Endocrinol.Metab* 89 (2004): 994-1005  
 Becker, T. M. et al., *Mol.Cancer* 8 (2009): 4  
 Bie, L. et al., *PLoS.One.* 6 (2011): e25631  
 Bilbao-Aldaiturriaga, N. et al., *Pediatr.Blood Cancer* 62 (2015): 766-769  
 50 Boland, A. et al., *Nat Struct.Mol.Biol* 20 (2013): 1289-1297  
 Bulk, E. et al., *Int.J Cancer* 137 (2015): 1306-1317  
 Cao, R. et al., *Br.J Cancer* 111 (2014): 539-550  
 Carvalho, L. et al., *Rev Port.Pneumol.* 15 (2009): 683-696  
 Chang, H. Y. et al., *PLoS.One.* 8 (2013): e54117  
 55 Chen, C. H. et al., *Oncotarget.* 5 (2014a): 6300-6311  
 Chen, Y. D. et al., *Zhonghua Lao.Dong.Wei Sheng Zhi.Ye.Bing.Za Zhi.* 30 (2012): 725-729  
 Chou, C. C. et al., *Expert.Rev Mol.Diagn.* 8 (2008): 179-187  
 Chung, F. Y. et al., *J Surg.Oncol* 102 (2010): 148-153  
 Cohen, Y. et al., *Hematology.* 19 (2014): 286-292  
 60 Cole, C. L. et al., *J Biol Chem* 289 (2014): 10488-10501  
 Courson, D. S. et al., *Exp.Cell Res* 334 (2015): 10-15

- Di, Maro G. et al., *J Clin Endocrinol.Metab* 99 (2014): E1617-E1626
- Ding, K. et al., *Med.Hypotheses* 83 (2014): 359-364
- Doherty, J. A. et al., *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 20 (2011): 1873-1882
- Duursma, A. et al., *Mol.Cell Biol* 25 (2005): 6937-6947
- 5 Egloff, A. M. et al., *Cancer Res* 66 (2006): 6-9
- Fan, C. G. et al., *Oncol Rep.* 26 (2011): 1281-1286
- Fang, Y. et al., *Cancer Biol Ther.* 15 (2014): 1268-1279
- Fang, Z. et al., *J Biol Chem* 288 (2013): 7918-7929
- Fang, Z. Q. et al., *Genet.Mol Res* 12 (2013): 1479-1489
- 10 Feng, B. et al., *J Gastroenterol.Hepatol.* 21 (2006): 1596-1603
- Ferreras, C. et al., *J Biol Chem* 287 (2012): 36132-36146
- Fields, A. P. et al., *Adv.Enzyme Regul.* 50 (2010): 190-200
- Flanagan, J. M. et al., *Mol.Cancer Ther.* 8 (2009): 249-260
- Freed, E. F. et al., *PLoS.Genet.* 8 (2012): e1002892
- 15 Goldenson, B. et al., *Oncogene* 34 (2015): 537-545
- Gomez, A. et al., *Mol.Pharmacol.* 78 (2010): 1004-1011
- Griffin, J. N. et al., *PLoS.Genet.* 11 (2015): e1005018
- Gutierrez-Camino, A. et al., *Pediatr.Res* 75 (2014): 767-773
- Ham, M. F. et al., *Cancer Sci.* 98 (2007): 1041-1047
- 20 Hanks, T. S. et al., *Apoptosis.* 17 (2012): 236-247
- Haren, N. et al., *Histol.Histopathol.* 25 (2010): 1247-1255
- Hatabe, S. et al., *Mol.Clin Oncol* 1 (2013): 845-850
- Hayama, S. et al., *Cancer Res* 67 (2007): 4113-4122
- Hegy, K. et al., *Pathobiology* 79 (2012): 314-322
- 25 Hill, S. J. et al., *Genes Dev.* 28 (2014): 1957-1975
- Hiramoto, T. et al., *Oncogene* 18 (1999): 3422-3426
- Hu, J. et al., *Pituitary.* 10 (2007): 47-52
- Hu, S. X. et al., *Zhonghua Lao.Dong.Wei Sheng Zhi.Ye.Bing.Za Zhi.* 31 (2013): 890-894
- Huff, L. P. et al., *Genes Cancer* 4 (2013): 460-475
- 30 Ishikawa, N. et al., *Cancer Sci.* 97 (2006): 737-745
- Ito, K. et al., *Protein Cell* 2 (2011): 755-763
- Jager, D. et al., *Cancer Res* 60 (2000): 3584-3591
- Januchowski, R. et al., *Biomed.Res Int* 2014 (2014): 365867
- Jin, Y. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* 7 (2014): 8724-8731
- 35 Jordheim, L. P. et al., *Biomark.Med.* 7 (2013): 663-671
- Jordheim, L. P. et al., *Lancet Oncol* 12 (2011): 693-702
- Ju, W. et al., *Oncol.Res.* 18 (2009): 47-56
- Kanda, A. et al., *Oncogene* 24 (2005): 7266-7272
- Kaplun, A. et al., *Crit Rev Eukaryot.Gene Expr.* 22 (2012): 249-258
- 40 Karlgren, M. et al., *Expert.Opin.Ther.Targets.* 11 (2007): 61-67
- Kas, K. et al., *J Biol Chem* 273 (1998): 23026-23032
- Kaur, S. et al., *BMC.Cell Biol* 9 (2008): 61
- Kim, D. H., *Yonsei Med.J* 48 (2007): 694-700
- Kim, D. S. et al., *J Proteome.Res* 9 (2010a): 3710-3719
- 45 Kim, J. E. et al., *J Cancer Res Clin Oncol* 136 (2010b): 47-53
- Kounelakis, M. G. et al., *IEEE J Biomed.Health Inform.* 17 (2013): 128-135
- Lages, E. et al., *PLoS.One.* 6 (2011): e20600
- Lallet-Daher, H. et al., *Oncogene* 28 (2009): 1792-1806
- Landrette, S. F. et al., *Blood* 105 (2005): 2900-2907
- 50 Langnaese, K. et al., *Cytogenet.Cell Genet.* 94 (2001): 233-240
- Lee, Y. C. et al., *Int.J Cancer* 122 (2008b): 1630-1638
- Li, B. et al., *Cancer Res* 61 (2001): 8014-8021
- Li, G. H. et al., *Bioinformatics.* 30 (2014): 748-752
- Li, J. F. et al., *Zhonghua Wei Chang Wai Ke.Za Zhi.* 15 (2012): 388-391
- 55 Li, Y. et al., *PLoS.One.* 8 (2013): e84489
- Liu, B. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* 7 (2014a): 3089-3100
- Liu, L. et al., *Retrovirology.* 8 (2011a): 94
- Liu, X. et al., *Eur.J Cancer* 50 (2014b): 2251-2262
- Liu, Y. et al., *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 18 (2009): 204-214
- 60 Liu, Y. et al., *J Cancer* 6 (2015b): 643-651
- Lonardo, F. et al., *Curr.Pharm.Des* 16 (2010): 1877-1881

- Lu, X. et al., *Mol.Cancer Ther.* 3 (2004): 861-872  
 Maass, N. et al., *Acta Oncol* 39 (2000): 931-934  
 Marchi, S. et al., *Cell Death.Dis.* 3 (2012): e304  
 Marioni, G. et al., *Acta Otolaryngol.* 129 (2009): 476-480  
 5 Marnef, A. et al., *Int.J Biochem.Cell Biol* 41 (2009): 977-981  
 Martin, L. et al., *Oncogene* 31 (2012): 4076-4084  
 Mason, J. M. et al., *Nucleic Acids Res.* 43 (2015): 3180-3196  
 Matsuda, R. et al., *Br.J Cancer* 104 (2011): 376-386  
 Medina, P. P. et al., *Epigenetics.* 3 (2008): 64-68  
 10 Mound, A. et al., *Eur.J Cancer* 49 (2013): 3738-3751  
 Naidu, S. R. et al., *Oncogene* 28 (2009): 2492-2501  
 Ng, Y. et al., *J Biol Chem* 279 (2004): 34156-34164  
 Nibbe, R. K. et al., *Mol Cell Proteomics.* 8 (2009): 827-845  
 Nishida, C. R. et al., *Mol.Pharmacol.* 78 (2010): 497-502  
 15 O'Geen, H. et al., *PLoS.Genet.* 3 (2007): e89  
 Ota, T. et al., *Cancer Res* 62 (2002): 5168-5177  
 Paliouras, M. et al., *Tumour.Biol* 29 (2008): 63-75  
 Papageorgio, C. et al., *Int.J Oncol.* 31 (2007): 1205-1211  
 Papageorgis, P. et al., *Cancer Res* 70 (2010): 968-978  
 20 Pohl, A. et al., *Pharmacogenomics.J* 11 (2011): 93-99  
 Pollari, S. et al., *Mol.Cancer Res* 10 (2012): 597-604  
 Qi, F. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* 8 (2015): 1666-1673  
 RefSeq, The NCBI handbook [Internet], Chapter 18, (2002),  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21091/>  
 25 Reisman, D. N. et al., *Cancer Res* 63 (2003): 560-566  
 Robles, L. D. et al., *J Biol Chem* 277 (2002): 25431-25438  
 Ryu, B. et al., *PLoS.One.* 2 (2007): e594  
 Sager, R. et al., *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 213 ( Pt 1) (1996): 51-64  
 Sakakura, C. et al., *Anticancer Res* 23 (2003): 3691-3697  
 30 Sakurai, Y. et al., *Mol.Pharm.* 11 (2014): 2713-2719  
 Sakurikar, N. et al., *J Biol Chem* 287 (2012): 39193-39204  
 Sheng, S., *Front Biosci.* 9 (2004): 2733-2745  
 Shihao, K. et al., *Cell Calcium* 48 (2010): 315-323  
 Shu, G. S. et al., *Cancer Biomark.* 11 (2012): 107-114  
 35 Stone, B. et al., *Gene* 267 (2001): 173-182  
 Strekalova, E. et al., *Clin.Cancer Res.* (2015)  
 Stutzer, I. et al., *J Biol Chem* 288 (2013): 10536-10547  
 Su, K. C. et al., *Dev.Cell* 21 (2011): 1104-1115  
 Sun, Y. et al., *Oncotarget.* 6 (2015b): 8244-8254  
 40 Takashima, S. et al., *Tumour.Biol.* 35 (2014): 4257-4265  
 Tatsuka, M. et al., *Cancer Res* 58 (1998): 4811-4816  
 Tsui, K. H. et al., *Sci.Rep.* 5 (2015): 12870  
 Van Ginkel, P. R. et al., *Biochim.Biophys.Acta* 1448 (1998): 290-297  
 Vanaja, D. K. et al., *Clin Cancer Res* 12 (2006): 1128-1136  
 45 Wang, G. et al., *Oncogene* 35 (2016): 651-661  
 Wang, G. et al., *Tumour.Biol* 36 (2015a): 1055-1065  
 Wang, Q. et al., *PLoS.One.* 8 (2013d): e70191  
 Wang, W. et al., *Int.J Cancer* 124 (2009b): 521-530  
 Wang, W. X. et al., *Sichuan.Da.Xue.Xue.Bao.Yi.Xue.Ban.* 40 (2009c): 857-860  
 50 Wierinckx, A. et al., *Endocr.Relat Cancer* 14 (2007): 887-900  
 Williams, K. A. et al., *PLoS.Genet.* 10 (2014): e1004809  
 Wu, M. X., *Apoptosis.* 8 (2003): 11-18  
 Wu, M. X. et al., *Expert.Opin.Ther.Targets.* 17 (2013): 593-606  
 Wu, S. et al., *Cell Cycle* 13 (2014a): 2869-2878  
 55 Wu, Z. et al., *Neoplasia.* 11 (2009): 66-76  
 Xu, F. et al., *Biochem.J* 416 (2008): 15-26  
 Yang, J. et al., *Surg.Oncol* 22 (2013): e53-e57  
 Yang, L. et al., *Cancer Res* 71 (2011a): 5558-5568  
 Yang, L. et al., *Future.Oncol* 8 (2012): 431-440  
 60 Yang, X. et al., *Biomed.Pharmacother.* 67 (2013): 681-684  
 Yang, Y. S. et al., *Lung Cancer* 74 (2011b): 12-24

- Yousef, G. M. et al., Tumour.Biol 26 (2005): 227-235  
 Yu, B. et al., Exp.Cell Res 315 (2009): 3086-3098  
 Zhang, F. et al., J Viral Hepat. 21 (2014a): 241-250  
 Zhang, K. et al., Tumour.Biol 35 (2014e): 7669-7673  
 5 Zhang, M. et al., Zhong.Nan.Da.Xue.Xue.Bao.Yi.Xue.Ban. 36 (2011a): 274-276  
 Zhang, Y. et al., Cancer Sci. 101 (2010): 934-940  
 Zheng, G. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. 364 (2007): 344-350  
 Follenzi A, et al. Nat Genet. 2000 Jun;25(2):217-22.  
 Zufferey R, et al. J Virol. 1999 Apr;73(4):2886-92.  
 10 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

## LISTARE SECVENȚE

<110> immatics biotechnologies GmbH

<120> Noi peptide și combinații de peptide și eșafodaje ale acestora  
 pentru utilizare în imunoterapie împotriva  
 carcinomului colorectal  
 (CRC) și a altor cancere

<130> I32811WO

<150> GB 1507719.1

<151> 2015-05-06

<150> US 62/157,684

<151> 2015-05-06

<160> 267

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala Leu Ile Lys Gln Leu Phe Glu Ala  
 1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Leu Leu Pro Arg Tyr Phe Phe Leu  
 1 5

<210> 3  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 3

Arg Leu Ile Pro Asp Thr Leu Tyr Ser Val  
1 5 10

<210> 4  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 4

Arg Leu Ala Glu Leu Thr Val Asp Glu Phe Leu  
1 5 10

<210> 5  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 5

Trp Leu Phe Asp Asp Gly Gly Leu Thr Leu  
1 5 10

<210> 6  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 6

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

<210> 7  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 7

Tyr Leu Thr Arg His Leu Ala Val Leu  
1 5

<210> 8  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 8

Ala Leu Met Leu Gln Gly Val Asp Leu Leu  
1 5 10

<210> 9  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 9

Ile Leu Asp Asp His Leu Ser Arg Val  
1 5

<210> 10  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 10

Arg Met Tyr Asn Lys Ile Phe Ala Ile  
1 5

<210> 11  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 11

Tyr Leu Phe Glu Lys Thr Phe Asn Met  
1 5

<210> 12  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 12

Ala Leu Val Gln Gly Ile Leu Glu Arg Val  
1 5 10

<210> 13  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 13

Phe Leu Leu Ala Glu Asp Thr Lys Val  
1 5

<210> 14  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 14

Phe Leu Asp Lys Pro Glu Asp Val Leu Leu  
1 5 10

<210> 15  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 15

Leu Gln Leu Asp Lys Glu Phe Gln Leu  
1 5

<210> 16  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 16

Val Leu Val Asp Gln Ser Trp Val Leu  
1 5

<210> 17  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 17

Ala Leu Ala Ala Ala Arg Val Glu Leu  
1 5

<210> 18

<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 18

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

<210> 19  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 19

Arg Leu Tyr Thr Lys Leu Leu Asn Glu Ala  
1 5 10

<210> 20  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 20

Tyr Leu Lys Asp Gly Asp Val Met Leu  
1 5

<210> 21  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 21

Val Leu Ile Asp His Arg Trp Val Leu  
1 5

<210> 22  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 22

Gly Leu Ile Asp Glu Val Met Val Leu  
1 5

<210> 23  
<211> 9

<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 23

Phe Leu Asp Ala Asn Gly His Phe Val  
1 5

<210> 24  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 24

Val Leu Asp Gly Val Leu Met Glu Leu  
1 5

<210> 25  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 25

Ser Leu Ala Asp Arg Leu Ile Gly Val  
1 5

<210> 26  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 26

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

<210> 27  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 27

Leu Leu Ala Asp Glu Asp Ser Ser Tyr Leu  
1 5 10

<210> 28  
<211> 9  
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Ala Leu Thr Glu Ile Gln Glu Phe Ile  
1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Gln Met Leu Asp Val Ala Ile Arg Val  
1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Gly Leu Ser Ser Ala Tyr Gly Gly Leu  
1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Leu Leu Tyr Gly Lys Tyr Val Ser Val  
1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Lys Leu Asn Thr Glu Thr Phe Gly Val  
1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Ala Leu Trp Glu Lys Asn Thr His Leu  
1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Ile Leu Leu Glu Lys Ser Val Ser Val  
1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Lys Leu Leu Asp Leu Thr Val Arg Ile  
1 5

<210> 36

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Gly Leu Leu Glu Ser Pro Ser Ile Phe Asn Phe Thr Ala  
1 5 10

<210> 37

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Gly Leu Phe Ala Gly Leu Gly Gly Ala Gly Ala  
1 5 10

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Ser Leu Ala Pro Thr Pro Val Ser Ala  
1 5

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Gly Leu Asn Gly Gly Ser Pro Ala Ala Ala  
1 5 10

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Ala Leu Ser Asn Val Ile His Lys Val  
1 5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Ile Leu Asp Asp Ser Phe Lys Leu Leu  
1 5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Ser Ile Leu Asp Asp Ser Phe Lys Leu  
1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Thr Leu Asp Ala Ala Gln Pro Arg Val  
1 5

<210> 44  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 44

Ser Leu Glu Ser Lys Leu Thr Ser Val  
1 5

<210> 45  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 45

Ala Leu Ala Glu Leu Leu His Gly Ala  
1 5

<210> 46  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 46

Gly Leu Asp Asp Arg Tyr Ser Leu Val  
1 5

<210> 47  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 47

Lys Leu Tyr Glu Arg Cys Glu Val Val  
1 5

<210> 48  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 48

Phe Leu Asp Ala Ser Asp Pro Ala Leu  
1 5

<210> 49  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 49

Ser Gly Met Gly Gly Ile Thr Ala Val  
1 5

<210> 50  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 50

Thr Leu Met Ala Glu Met His Val Val  
1 5

<210> 51  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 51

Gln Val Trp Glu Ile Gln His Thr Val  
1 5

<210> 52  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 52

Ala Leu Asp Ser Ser Asn Ser Met Gln Thr Ile  
1 5 10

<210> 53  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 53

Phe Leu Leu Gly Ser Glu Ile Lys Leu

1

5

<210> 54  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 54

Ala Leu Leu Asn Gly Glu Tyr Leu Leu Ala Ala  
1 5 10

<210> 55  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 55

Gln Ile Ile Thr Ser Val Val Ser Val  
1 5

<210> 56  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 56

Val Leu Phe Thr Asp Glu Gly Val Pro Lys Phe Leu  
1 5 10

<210> 57  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 57

Asn Leu Leu Glu Lys Glu Asn Tyr Leu  
1 5

<210> 58  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 58

Ala Met Ala Asp Lys Met Asp Met Ser Leu  
1 5 10

<210> 59  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 59

Leu Leu Thr Asp Asn Val Val Lys Leu  
1 5

<210> 60  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 60

Val Leu Asp Glu Asp Glu Pro Arg Phe Leu  
1 5 10

<210> 61  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 61

Lys Leu Leu Lys Leu Phe Gln Gly Val  
1 5

<210> 62  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 62

Tyr Leu Ala Pro Glu Asn Gly Tyr Leu  
1 5

<210> 63  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 63

Lys Leu Phe Ser Ile Leu Ser Thr Val  
1 5

<210> 64  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 64

Lys Thr Leu Gly Lys Leu Trp Arg Leu  
1 5

<210> 65  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 65

Phe Gly Ala Pro Gly Ile Ile Ser Ala  
1 5

<210> 66  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 66

Gly Leu Asp Asp Gly Pro Asp Phe Leu  
1 5

<210> 67  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 67

Ser Leu Asn Asp Leu Glu Lys Asp Val Met Leu Leu  
1 5 10

<210> 68  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 68

Ser Ile Leu Gln Phe Val His Met Val  
1 5

<210> 69  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 69

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

<210> 70  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 70

Met Ile Ser Glu Leu Glu Val Arg Leu  
1 5

<210> 71  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 71

Arg Leu Trp Thr Glu Ile Pro Thr Ala Ile  
1 5 10

<210> 72  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 72

Tyr Leu Leu Asp Tyr Pro Asn Asn Leu Leu  
1 5 10

<210> 73  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 73

Tyr Leu Phe Asp Ile Ala Val Ser Met  
1 5

<210> 74

<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 74

Tyr Leu Met Gly Phe Leu His Ala Val  
1 5

<210> 75  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 75

Glu Met Ile Glu Asn Ile Gln Ser Val  
1 5

<210> 76  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 76

Tyr Leu Ile Gly Glu Lys Gln His Tyr Leu  
1 5 10

<210> 77  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 77

Ser Leu Leu Lys Arg Asp Phe Gly Ala  
1 5

<210> 78  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 78

Ala Leu Asp Pro Glu Leu Leu Leu Leu  
1 5

<210> 79  
<211> 10

# MD/EP 3291830 T2 2021.04.30

61

<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 79

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

<210> 80  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 80

Gln Val Asp Glu Val Val Asp Ile Met Arg Val  
1 5 10

<210> 81  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 81

Ala Leu Leu Ser Gln Gln Thr His Leu  
1 5

<210> 82  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 82

Gln Leu Tyr Glu Glu Pro Asp Thr Lys Leu  
1 5 10

<210> 83  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 83

Leu Thr Ile Glu Asp Gly Ile Phe Glu Val  
1 5 10

<210> 84  
<211> 11  
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

Ser Met Val Glu Asp Ile Thr Gly Leu Arg Leu  
1 5 10

<210> 85

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Ile Leu His Asp Ile Asn Ser Asp Gly Val Leu  
1 5 10

<210> 86

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

Lys Val Phe Pro Gly Lys Ile Ser Val  
1 5

<210> 87

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

Leu Leu Phe Asp Ala Pro Asp Leu Arg Leu  
1 5 10

<210> 88

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

Lys Leu Asp Ile Lys Val Glu Thr Val  
1 5

<210> 89

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

Ser Leu Ile Glu Tyr Glu Phe Arg Val  
1 5

<210> 90

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

Gly Leu Leu Lys Pro Gly Leu Asn Val Val Leu  
1 5 10

<210> 91

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

Thr Val Asp Val Ala Thr Pro Ser Val  
1 5

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

Trp Ile Asp Asp Thr Ser Ala Phe Val  
1 5

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

Ser Leu Gln Glu Leu Arg Leu Leu Leu  
1 5

<210> 94

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

Lys Ser Met Asp Ile Val Leu Thr Val  
1 5

<210> 95

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

Ala Ile Leu Asp Ala His Ile Glu Val  
1 5

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 96

Lys Leu Tyr Ser Arg Leu Val Tyr Val  
1 5

<210> 97

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 97

Ala Leu Trp Trp Gly Val Val Thr Val  
1 5

<210> 98

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 98

Ala Met Asn Gly Lys Ser Phe Ser Val  
1 5

<210> 99

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 99

Lys Leu Leu Glu Val Asp Leu Asp Thr Val  
1 5 10

<210> 100  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 100

Ser Leu Asp Asp Phe Leu Ala Thr Ala  
1 5

<210> 101  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 101

Gly Leu Ser Glu Gly His Thr Phe Gln Val  
1 5 10

<210> 102  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 102

Lys Ile Leu Val Ser Leu Ile Glu Val  
1 5

<210> 103  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 103

Phe Leu Phe Gly Tyr Pro Lys Arg Leu  
1 5

<210> 104  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 104

# MD/EP 3291830 T2 2021.04.30

66

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

<210> 105  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 105

Tyr Ala Leu Asp Leu Ser Thr Phe Leu  
1 5

<210> 106  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 106

Ser Leu Ile Ser Glu Lys Ile Leu Leu  
1 5

<210> 107  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 107

Ala Leu Leu Gly Gly Gly Pro Tyr Met Leu  
1 5 10

<210> 108  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 108

Ser Leu Ala Glu Leu Val Pro Gly Val Gly Gly Ile  
1 5 10

<210> 109  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 109

Ala Leu Asp Gly Asp Gln Met Glu Leu

1

5

<210> 110  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 110

Leu Leu Gly Glu Leu Pro Arg Leu Leu Leu Leu  
1 5 10

<210> 111  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 111

His Met Asp Asp Gly Gly Tyr Ser Met  
1 5

<210> 112  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 112

Lys Leu Gly Gln Val Leu Ile Tyr Leu  
1 5

<210> 113  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 113

Ile Leu Tyr Asp Leu Gln Gln Asn Leu  
1 5

<210> 114  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 114

Thr Ala Val Gly His Ala Leu Val Leu  
1 5

<210> 115  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 115

Ser Leu Phe Asp Val Ser His Met Leu  
1 5

<210> 116  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 116

Leu Val Tyr Gln Phe Val His Pro Ile  
1 5

<210> 117  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 117

Thr Leu Gln Pro Val Asp Asn Ser Thr Ile Ser Leu  
1 5 10

<210> 118  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 118

Leu Leu Ala Asp Leu Lys Thr Met Val  
1 5

<210> 119  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 119

Ile Leu Tyr Gln Thr Val Thr Gly Leu  
1 5

<210> 120  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 120

Val Leu Tyr Glu Gly Val Asp Glu Val  
1 5

<210> 121  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 121

Ser Leu Ala Pro Asn Ile Ile Ser Gln Leu  
1 5 10

<210> 122  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 122

Ser Leu Met Gly Met Val Leu Lys Leu  
1 5

<210> 123  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 123

Lys Thr Leu Glu Arg Ser Tyr Leu Leu  
1 5

<210> 124  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 124

Arg Val Leu Pro Pro Ser Ala Leu Gln Ser Val  
1 5 10

<210> 125  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 125

Lys Leu Gly Asp Phe Gly Leu Leu Val Glu Leu  
1 5 10

<210> 126  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 126

Thr Leu Ala Lys Tyr Leu Met Glu Leu  
1 5

<210> 127  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 127

Arg Leu Ala Glu Leu Thr Val Asp Glu Phe Leu Ala  
1 5 10

<210> 128  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 128

Met Leu Asp Asp Arg Ala Tyr Leu Val  
1 5

<210> 129  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 129

Val Leu Ile Asp Val Leu Lys Glu Leu  
1 5

<210> 130

<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 130

Gly Leu Gly Gly Ser Gln Leu Ile Asp Thr His Leu  
1 5 10

<210> 131  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 131

Lys Leu Leu Asp Val Val His Pro Ala  
1 5

<210> 132  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 132

Ala Leu Leu Asn Ala Ile Leu His Ser Ala  
1 5 10

<210> 133  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 133

Arg Thr Phe Glu Lys Ile Glu Glu Val  
1 5

<210> 134  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 134

Gly Val Ala Gly Gly Ser Ile Leu Lys Gly Val  
1 5 10

<210> 135  
<211> 9

<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 135

Lys Leu Gln Glu Glu Ile Pro Val Leu  
1 5

<210> 136  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 136

Lys Leu Phe Asp Ile Phe Ser Gln Gln Val  
1 5 10

<210> 137  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 137

Gln Leu Thr Glu Ile Lys Pro Leu Leu  
1 5

<210> 138  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 138

Lys Gln Phe Glu Gly Thr Val Glu Ile  
1 5

<210> 139  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 139

Val Leu Leu Asn Glu Ile Leu Glu Gln Val  
1 5 10

<210> 140  
<211> 9  
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 140

Leu Leu Asn Glu Ile Leu Glu Gln Val  
1 5

<210> 141

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 141

Ala Val Ile Glu His Leu Glu Arg Leu  
1 5

<210> 142

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 142

Ser Leu Val Gln Arg Val Glu Thr Ile  
1 5

<210> 143

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 143

Lys Leu Ser Asp Val Trp Lys Glu Leu  
1 5

<210> 144

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 144

Leu Leu Asn Asp Arg Ile Trp Leu Ala  
1 5

<210> 145

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 145

Leu Leu Leu Glu Val Val Lys Gln Val  
1 5

<210> 146

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 146

Ala Leu Ser Asp Glu Thr Trp Gly Leu  
1 5

<210> 147

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 147

Thr Leu Thr Glu Leu Arg Ala Phe Leu  
1 5

<210> 148

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 148

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

<210> 149

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 149

Tyr Gln Phe Asp Lys Val Gly Ile Leu Thr Leu  
1 5 10

<210> 150

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 150

Arg Leu Ala Asp Leu Glu Ala Leu Lys Val  
1 5 10

<210> 151

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 151

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

<210> 152

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 152

Lys Leu Leu Ala Val Ile His Glu Leu  
1 5

<210> 153

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 153

Ile Leu Phe Ser Glu Asp Ser Thr Lys Leu Phe Val  
1 5 10

<210> 154

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 154

Lys Leu Pro Ser Glu Thr Ile Phe Val Gly Cys  
1 5 10

<210> 155

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 155

Arg Leu Leu Gly Glu Glu Val Val Arg Val  
1 5 10

<210> 156  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 156

Ser Leu Met Met Thr Ile Ile Asn Leu  
1 5

<210> 157  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 157

Ser Leu Ile Glu Arg Asp Leu Lys Leu  
1 5

<210> 158  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 158

Gly Leu Leu Asp Pro Ser Val Phe His Val  
1 5 10

<210> 159  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 159

Val Leu Val Asp Asp Asp Gly Ile Lys Val Val  
1 5 10

<210> 160  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 160

# MD/EP 3291830 T2 2021.04.30

77

Lys Leu Leu Glu Phe Asp Gln Leu Gln Leu  
1 5 10

<210> 161  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 161

Phe Leu Lys Asn Glu Leu Asp Asn Val  
1 5

<210> 162  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 162

Lys Leu Met Asp Tyr Ile Asp Glu Leu  
1 5

<210> 163  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 163

Arg Leu Leu His Glu Val Gln Glu Leu  
1 5

<210> 164  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 164

Lys Met Leu Asp Glu Ile Leu Leu Gln Leu  
1 5 10

<210> 165  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 165

Arg Leu Leu Asp Phe Pro Glu Ala Met Val Leu

1 5 10

<210> 166  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 166

Gly Leu Leu Glu Ala Arg Gly Ile Leu Gly Leu  
1 5 10

<210> 167  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 167

Ser Val Ile Asp His Ile His Leu Ile Ser Val  
1 5 10

<210> 168  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 168

Gly Leu Ile Arg Phe Pro Leu Met Thr Ile  
1 5 10

<210> 169  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 169

Tyr Leu Ala His Phe Ile Glu Gly Leu  
1 5

<210> 170  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 170

Ala Leu Ala Gly Gly Ile Thr Met Val  
1 5

<210> 171  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 171

Arg Leu Gln Glu Thr Glu Gly Met Val Ala Val  
1 5 10

<210> 172  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 172

Leu Leu Leu Asp Thr Val Thr Met Gln Val  
1 5 10

<210> 173  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 173

Lys Leu Gly Asp Leu Met Val Leu Leu  
1 5

<210> 174  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 174

Ile Leu Leu Asp Asp Asn Met Gln Ile Arg Leu  
1 5 10

<210> 175  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 175

Thr Leu Leu Gly Gly Lys Glu Ala Gln Ala Leu Gly Val  
1 5 10

<210> 176  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 176

Arg Thr Leu Asp Lys Val Leu Glu Val  
1 5

<210> 177  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 177

Ala Leu Leu Gln Gly Ala Ile Glu Ser Val  
1 5 10

<210> 178  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 178

Tyr Leu Phe Arg Glu Pro Ala Thr Ile  
1 5

<210> 179  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 179

Arg Leu Leu Ser Pro Leu Ser Ser Ala  
1 5

<210> 180  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 180

Asn Leu Leu Glu Ile Ala Pro His Leu  
1 5

<210> 181  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 181

Asn Leu Phe Asp Leu Gly Gly Gln Tyr Leu Arg Val  
1 5 10

<210> 182  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 182

Ser Leu Asn Lys Trp Ile Phe Thr Val  
1 5

<210> 183  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 183

Thr Leu Gln Glu Val Val Thr Gly Val  
1 5

<210> 184  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 184

Ser Leu Leu Asp Glu Asn Asn Val Ser Ser Tyr Leu  
1 5 10

<210> 185  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 185

Val Leu Tyr Thr Gly Val Val Arg Val  
1 5

<210> 186

<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 186

Lys Met Ser Glu Lys Ile Leu Leu Leu  
1 5

<210> 187  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 187

Gly Leu His Asn Val Val Tyr Gly Ile  
1 5

<210> 188  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 188

Phe Leu Val Asp Gly Pro Arg Val Gln Leu  
1 5 10

<210> 189  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 189

Ala Ile Ser Glu Val Ile Gly Lys Ile Thr Ala  
1 5 10

<210> 190  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 190

Ala Met Ala Glu Met Val Leu Gln Val  
1 5

<210> 191  
<211> 9

<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 191

Gln Leu Phe Ser Glu Ile His Asn Leu  
1 5

<210> 192  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 192

Lys Ile Gln Glu Met Gln His Phe Leu  
1 5

<210> 193  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 193

Lys Leu Ser Pro Thr Val Val Gly Leu  
1 5

<210> 194  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 194

Ser Leu Tyr Lys Gly Leu Leu Ser Val  
1 5

<210> 195  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 195

Leu Leu Leu Gly Glu Arg Val Ala Leu  
1 5

<210> 196  
<211> 9  
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 196

Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val  
1 5

<210> 197

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 197

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

<210> 198

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 198

Val Leu Tyr Gly Pro Asp Val Pro Thr Ile  
1 5 10

<210> 199

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 199

Phe Leu Leu Glu Arg Glu Gln Leu Leu  
1 5

<210> 200

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 200

Ser Ala Val Asp Phe Ile Arg Thr Leu  
1 5

<210> 201

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 201

Gly Ser Phe Asn Gly Ala Leu Ala Ala Val  
1 5 10

<210> 202

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 202

Gly Leu Ala Ala Leu Ala Val His Leu  
1 5

<210> 203

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 203

Lys Leu Ile Asp Leu Ser Gln Val Met Tyr Leu  
1 5 10

<210> 204

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 204

Lys Leu Leu Asp Leu Glu Thr Glu Arg Ile Leu Leu  
1 5 10

<210> 205

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 205

Arg Leu His Asp Glu Asn Ile Leu Leu  
1 5

<210> 206

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 206

Arg Ile Ala Gly Ile Arg Gly Ile Gln Gly Val  
1 5 10

<210> 207

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 207

Lys Leu Cys Glu Gly Phe Asn Glu Val  
1 5

<210> 208

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 208

Arg Leu Ile Asp Arg Ile Lys Thr Val  
1 5

<210> 209

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 209

Lys Leu Gln Asp Gly Leu Leu His Ile  
1 5

<210> 210

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 210

Lys Leu Ala Val Ala Leu Leu Ala Ala  
1 5

<210> 211

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 211

Ser Leu Phe Gly Lys Lys Tyr Ile Leu  
1 5

<210> 212  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 212

Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ala Asn Val  
1 5

<210> 213  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 213

Leu Leu Trp Ala Pro Thr Ala Gln Ala  
1 5

<210> 214  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 214

Ser Val Leu Glu Lys Glu Ile Tyr Ser Ile  
1 5 10

<210> 215  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 215

Lys Leu Gln Glu Lys Ile Gln Glu Leu  
1 5

<210> 216  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 216

# MD/EP 3291830 T2 2021.04.30

88

Tyr Leu Trp Asp Leu Asp His Gly Phe Ala Gly Val  
1 5 10

<210> 217  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 217

Lys Leu Leu Asp Thr Met Val Asp Thr Phe Leu  
1 5 10

<210> 218  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 218

Lys Leu Ser Trp Asp Leu Ile Tyr Leu  
1 5

<210> 219  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 219

Phe Leu Asp Glu Lys Gly Arg Cys Val  
1 5

<210> 220  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 220

Lys Met Asp Pro Val Ala Tyr Arg Val  
1 5

<210> 221  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 221

Ile Leu Asn Val Asp Gly Leu Ile Gly Val

1 5 10

<210> 222  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 222

Gly Val Ile Ala Glu Ile Leu Arg Gly Val  
1 5 10

<210> 223  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 223

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

<210> 224  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 224

Gln Leu Gln Glu Gly Lys Asn Val Ile Gly Leu  
1 5 10

<210> 225  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 225

Tyr Leu Tyr Gly Gln Thr Thr Thr Tyr Leu  
1 5 10

<210> 226  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 226

Phe Leu Val Asp Gly Ser Trp Ser Val  
1 5

<210> 227  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 227

Leu Thr Ala Pro Pro Glu Ala Leu Leu Met Val  
1 5 10

<210> 228  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 228

Ser Met Ser Gly Tyr Asp Gln Val Leu  
1 5

<210> 229  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 229

Tyr Leu Leu Glu Lys Phe Val Ala Val  
1 5

<210> 230  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 230

Ala Met Ser Ser Lys Phe Phe Leu Val  
1 5

<210> 231  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 231

Arg Leu Phe Ala Asp Ile Leu Asn Asp Val  
1 5 10

<210> 232  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 232

Arg Leu Leu Asp Ser Val Ser Arg Leu  
1 5

<210> 233  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 233

Arg Leu Asp Asp Leu Lys Met Thr Val  
1 5

<210> 234  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 234

Lys Met Phe Glu Ser Phe Ile Glu Ser Val  
1 5 10

<210> 235  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 235

Leu Leu His Glu Glu Asn Phe Ser Val  
1 5

<210> 236  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 236

Lys Met Ser Glu Leu Gln Thr Tyr Val  
1 5

<210> 237  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 237

Lys Leu Val Glu Phe Asp Phe Leu Gly Ala  
1 5 10

<210> 238  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 238

Asn Met Leu Glu Ala Val His Thr Ile  
1 5

<210> 239  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 239

Gln Leu Ile Glu Lys Asn Trp Leu Leu  
1 5

<210> 240  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 240

Val Leu Ala Pro Arg Val Leu Arg Ala  
1 5

<210> 241  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 241

Ile Leu Ile Asp Trp Leu Val Gln Val  
1 5

<210> 242

<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 242

Arg Leu Glu Glu Asp Asp Gly Asp Val Ala Met  
1 5 10

<210> 243  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 243

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

<210> 244  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 244

Ser Leu His Phe Leu Ile Leu Tyr Val  
1 5

<210> 245  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 245

Gln Leu Ile Asp Tyr Glu Arg Gln Leu  
1 5

<210> 246  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 246

Gly Leu Thr Asp Asn Ile His Leu Val  
1 5

<210> 247  
<211> 9

<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 247

Ser Leu Asp Thr Leu Met Thr Tyr Val  
1 5

<210> 248  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 248

Ala Leu Tyr Gly Asp Ile Asp Ala Val  
1 5

<210> 249  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 249

Ala Leu Tyr Gly Arg Leu Glu Val Val  
1 5

<210> 250  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 250

Ala Leu Cys Glu Glu Asn Met Arg Gly Val  
1 5 10

<210> 251  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 251

Ser Leu Leu Gln Ala Thr Asp Phe Met Ser Leu  
1 5 10

<210> 252  
<211> 9  
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 252

Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile Tyr Leu  
1 5

<210> 253

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 253

Lys Leu Leu Asp Glu Val Thr Tyr Leu Glu Ala  
1 5 10

<210> 254

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 254

Val Leu Phe Gln Glu Ala Leu Trp His Val  
1 5 10

<210> 255

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 255

Ala Leu Ala Leu Trp Ile Pro Ser Leu  
1 5

<210> 256

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 256

Gly Leu Leu Glu Glu Leu Val Thr Val  
1 5

<210> 257

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 257

Ser Leu Ala Asp Phe Met Gln Glu Val  
1 5

<210> 258

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 258

Leu Leu Tyr Glu Gly Lys Leu Thr Leu  
1 5

<210> 259

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 259

Ala Leu Ala Asp Lys Glu Leu Leu Pro Ser Val  
1 5 10

<210> 260

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 260

Ala Leu Leu Ala Glu Gly Ile Thr Trp Val  
1 5 10

<210> 261

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 261

Tyr Leu Tyr Asp Ser Glu Thr Lys Asn Ala  
1 5 10

<210> 262

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 262

Val Leu Ala Lys Pro Gly Val Ile Ser Val  
1 5 10

<210> 263

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 263

Leu Leu Ala Gly Gln Thr Tyr His Val  
1 5

<210> 264

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 264

Arg Leu Leu Asp Val Leu Ala Pro Leu Val  
1 5 10

<210> 265

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 265

Leu Leu Asp Lys Lys Ile Gly Val  
1 5

<210> 266

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 266

Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val  
1 5 10

<210> 267

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 267

Tyr Leu Leu Pro Ala Ile Val His Ile  
1 5

**(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:**

- WO-A1-2004/037282
- STENSTEDT KRISTINA ET AL: "The Expression of CYP2W1: A Prognostic Marker in Colon Cancer", ANTICANCER RESEARCH, vol. 32, no. 9, September 2012 (2012-09), pages 3869-3874, XP002789933,
- DATABASE UniProt [Online] 1 December 2001 (2001-12-01), "SubName: Full=C9orf140 protein {ECO:0000313|EMBL:AAH09435.1}; Flags: Fragment;"; XP002759848, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q96GJ3 Database accession no. Q96GJ3
- WO-A1-2004/037282
- WEINSCHENK T ET AL: "Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines", CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 62, no. 20, 15 October 2002 (2002-10-15), pages 5818-5827, XP002266492, ISSN: 0008-5472
- WO-A1-2015/018805
- WO-A1-2015/018805
- STENSTEDT KRISTINA ET AL: "The Expression of CYP2W1: A Prognostic Marker in Colon Cancer", ANTICANCER RESEARCH, vol. 32, no. 9, September 2012 (2012-09), pages 3869-3874, XP002789933,
- WO-A1-2015/018805
- WO-A2-2009/015842
- WO-A2-2009/015842
- WO-A2-2009/015842
- CN-A- 101 168 566

**(57) Revendicări:**

1. O peptidă constând din secvența de aminoacizi conformă cu SEQ ID NO: 22 sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia, în care peptida menționată are abilitatea de a se lega de o moleculă a complexului major de histocompatibilitate (MHC) uman de clasă I și în care peptida menționată este capabilă să fie recunoscută de celule T CD8.

2. Peptida conformă cu Revendicarea 1, unde respectiva peptidă include legături nepeptidice și/sau respectiva peptidă face parte dintr-o proteină de fuziune care conține aminoacizi N-terminali ai lanțului invariabil asociat antigenului HLA-DR (Ii).

3. Un anticorp, solubil sau legat de membrană, care recunoaște în mod specific peptida conform Revendicării 1 sau peptida conform Revendicării 1 care este legată de o moleculă MHC.

4. Un receptor de celule T (TCR), solubil sau legat de membrană, care este reactiv cu un ligand HLA legat de o moleculă MHC, în care ligandul respectiv constă din secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 22.

5. Un acid nucleic care codifică o peptidă în conformitate cu Revendicarea 1 sau Revendicarea 2, TCR-ul în conformitate cu Revendicarea 4 sau un vector de exprimare care exprimă acidul nucleic menționat.

6. O celulă-gazdă recombinantă conținând peptida în conformitate cu Revendicarea 1 sau Revendicarea 2 ori acidul nucleic sau vectorul de exprimare în conformitate cu Revendicarea 5.

7. Celula-gazdă recombinantă în conformitate cu Revendicarea 6, în care respectiva celulă-gazdă este o celulă prezentatoare de antigen pentru respectivul acid nucleic sau vectorul de exprimare care codifică o peptidă, sau o celulă T sau celulă NK pentru respectivul acid nucleic sau vectorul de exprimare care codifică un TCR.

8. O metodă pentru producerea peptidei în conformitate cu Revendicarea 1 sau Revendicarea 2, metoda care cuprinde cultivarea unei celule-gazdă în conformitate cu Revendicarea 6 sau Revendicarea 7 care prezintă peptida în conformitate cu Revendicarea 1 sau Revendicarea 2 sau exprimă acidul nucleic ori vectorul de exprimare în conformitate cu Revendicarea 5 și izolarea respectivei peptide sau a respectivului TCR din celula-gazdă și/sau mediul său de cultură.

9. O metodă *in vitro* pentru producerea de limfocite T activate, metoda cuprinzând contactarea *in vitro* a celulelor T cu molecule de MHC de clasă I umane încărcate cu antigen exprimate pe suprafața unei celule prezentatoare de antigen adecvate sau o construcție artificială care imită o celulă prezentatoare de antigen pentru o perioadă de timp suficientă pentru a activa numitele celule T într-o manieră specifică antigenului, în care respectivul antigen este o peptidă în conformitate cu Revendicarea 1.

10. O celulă T activată produsă prin metoda în conformitate cu Revendicarea 9 care recunoaște selectiv o celulă care exprimă aberant o peptidă cuprinzând secvența de aminoacizi dată în Revendicarea 1.

11. O compoziție farmaceutică cuprinzând cel puțin un ingredient activ selectat din grupul constând din peptida în conformitate cu Revendicarea 1 sau Revendicarea 2, anticorpul în conformitate cu Revendicarea 3, TCR-ul în conformitate cu Revendicarea 4, acidul nucleic sau vectorul de exprimare în conformitate cu Revendicarea 5, celula-gazdă recombinantă cuprinzând vectorul de exprimare în conformitate cu Revendicarea 6 sau Revendicarea 7, celula T activată în conformitate cu Revendicarea 10 și un purtător acceptabil farmaceutic.

12. Peptida în conformitate cu Revendicarea 1 sau Revendicarea 2, anticorpul în conformitate cu Revendicarea 3, TCR-ul în conformitate cu Revendicarea 4, acidul nucleic sau vectorul de exprimare în conformitate cu Revendicarea 5, celula-gazdă recombinantă cuprinzând vectorul de exprimare în conformitate cu Revendicarea 6 sau Revendicarea 7, celula T activată în conformitate cu Revendicarea 10 sau compoziția farmaceutică în conformitate cu Revendicarea 11 pentru utilizare în medicină.

13. Peptida în conformitate cu Revendicarea 1 sau Revendicarea 2, anticorpul în conformitate cu Revendicarea 3, TCR-ul în conformitate cu Revendicarea 4, acidul nucleic sau vectorul de exprimare în conformitate cu Revendicarea 5, celula-gazdă recombinantă cuprinzând vectorul de exprimare în conformitate cu Revendicarea 6 sau Revendicarea 7, celula T activată în conformitate cu Revendicarea 10 sau compoziția farmaceutică în conformitate cu Revendicarea 11 pentru utilizare în tratarea cancerului.

14. Peptida, anticorpul, TCR-ul, acidul nucleic sau vectorul de exprimare, celula-gazdă recombinantă, celula T activată sau compoziția farmaceutică pentru utilizare în conformitate cu Revendicarea 13, în care respectivul cancer este selectat din grupul de cancer pulmonar, cancer cerebral, cancer hepatic, cancer renal, cancer colorectal, cancer hepatic, cancer pancreatic, cancer de prostată, leucemie, cancer de glandă mamară, carcinom cu celule Merkel, melanom, cancer ovarian și cancer esofagian și alte tumori care prezintă o supraexprimare a unei proteine din care o peptidă SEQ ID NO: 22 este derivată.

15. O trusă cuprinzând un recipient conținând o compoziție farmaceutică cuprinzând cel puțin un ingredient activ selectat din grupul constând din peptida în conformitate cu Revendicarea 1 sau Revendicarea 2, anticorpul în conformitate cu Revendicarea 3, acidul nucleic sau vectorul de exprimare în conformitate cu Revendicarea 5, celula-gazdă cuprinzând vectorul de exprimare în conformitate cu Revendicarea 6 sau Revendicarea 7 ori celula T activată în conformitate cu Revendicarea 10 în soluție sau în formă liofilizată.

16. Trusa de la Revendicarea 15 care mai cuprinde un al doilea recipient conținând un diluant sau o soluție de reconstituire pentru formula liofilizată.

Peptidă: ALIKQLFEA (A\*02) SEQ ID NO: 1

Prezentare relativă [unități arbitrare]

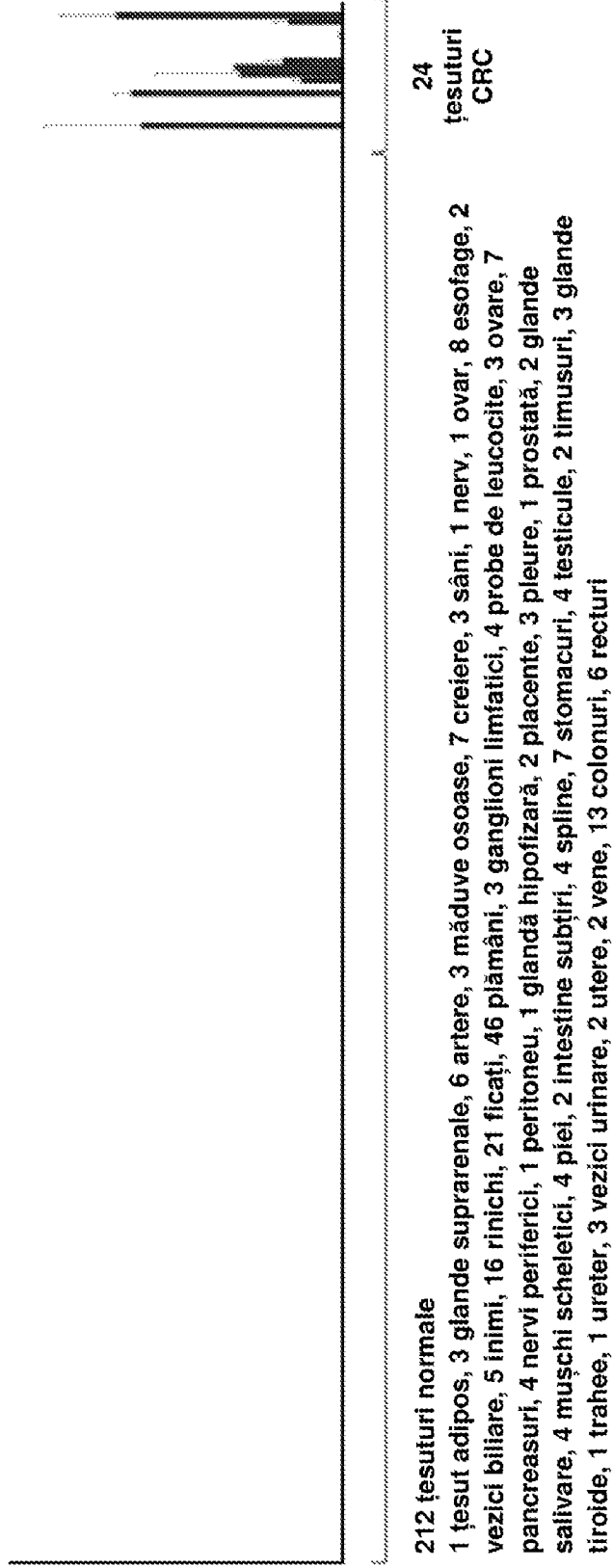


Figura 1A

Peptidă: KQFEGTVEI (A\*02) – SEQ ID NO: 138

Prezentare relativă [unități arbitrare]

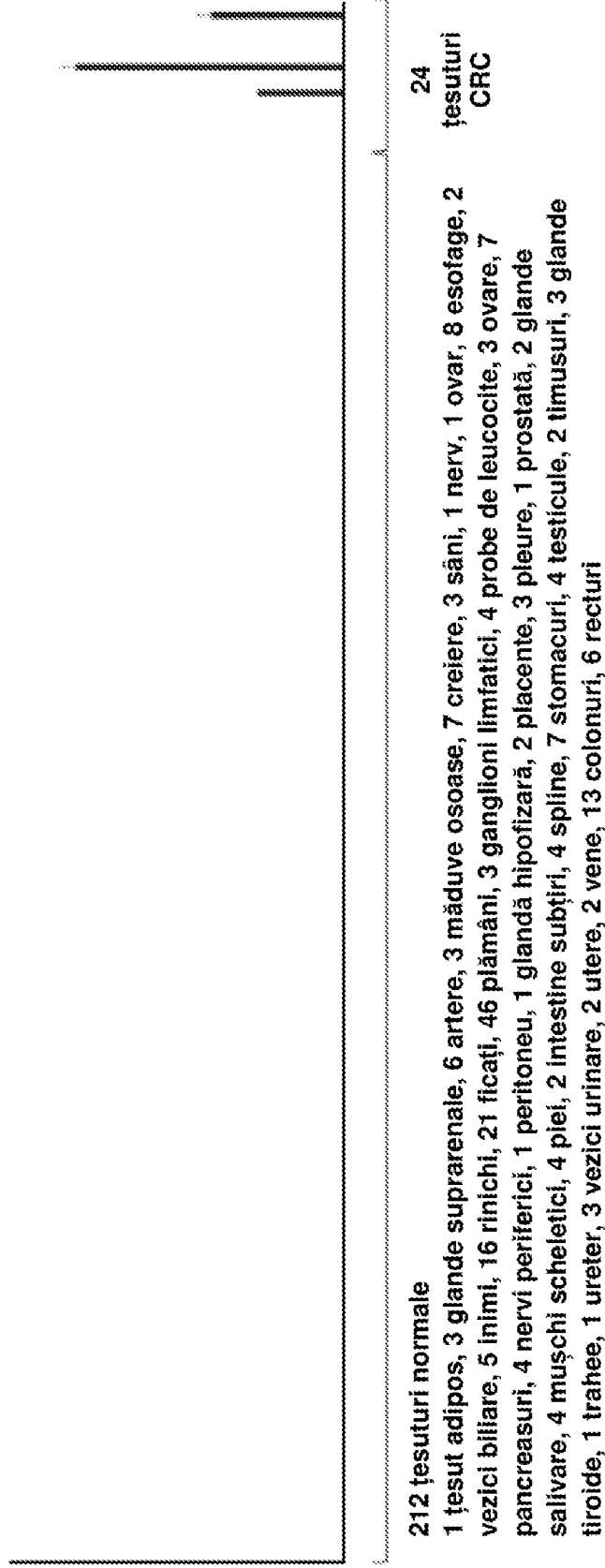


Figura 1B

Peptidă: KLAVALLAA (A\*02) – SEQ.ID NO: 210

Prezentare relativă [unități arbitrare]

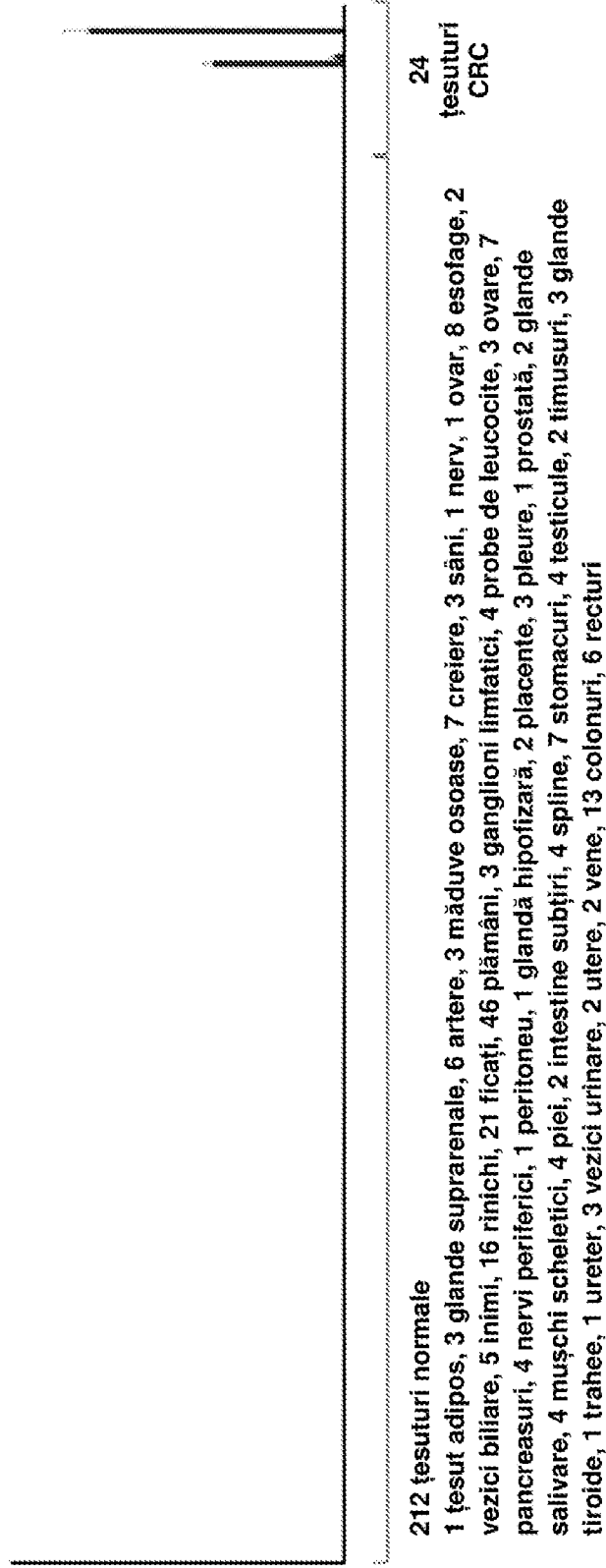
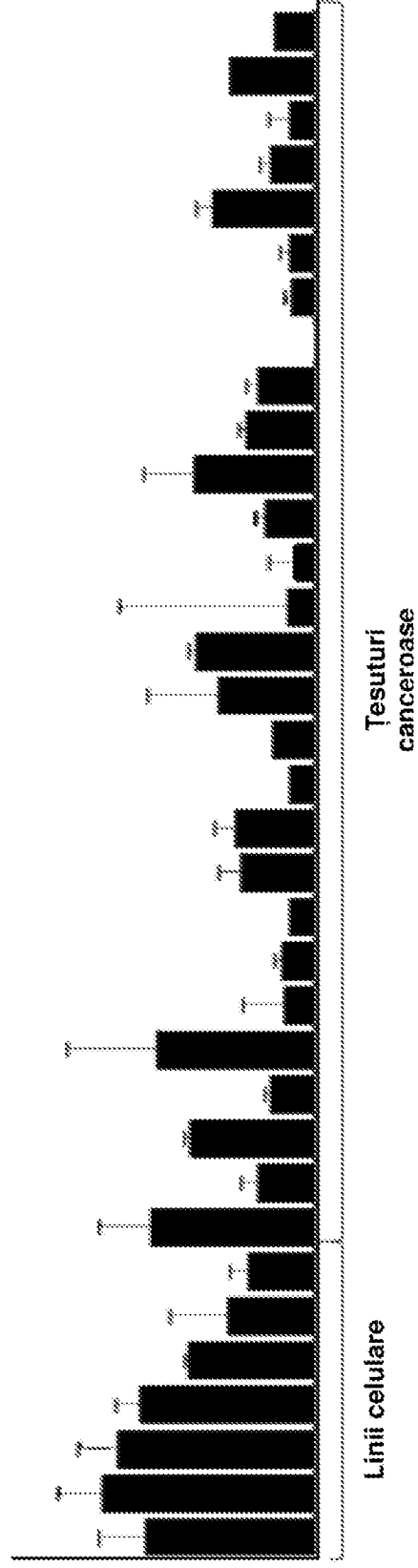


Figura 1C

Peptidă: LLYGKYVSV (A\*02) – SEQ ID NO: 31

Prezentare relativă [unități arbitrare]

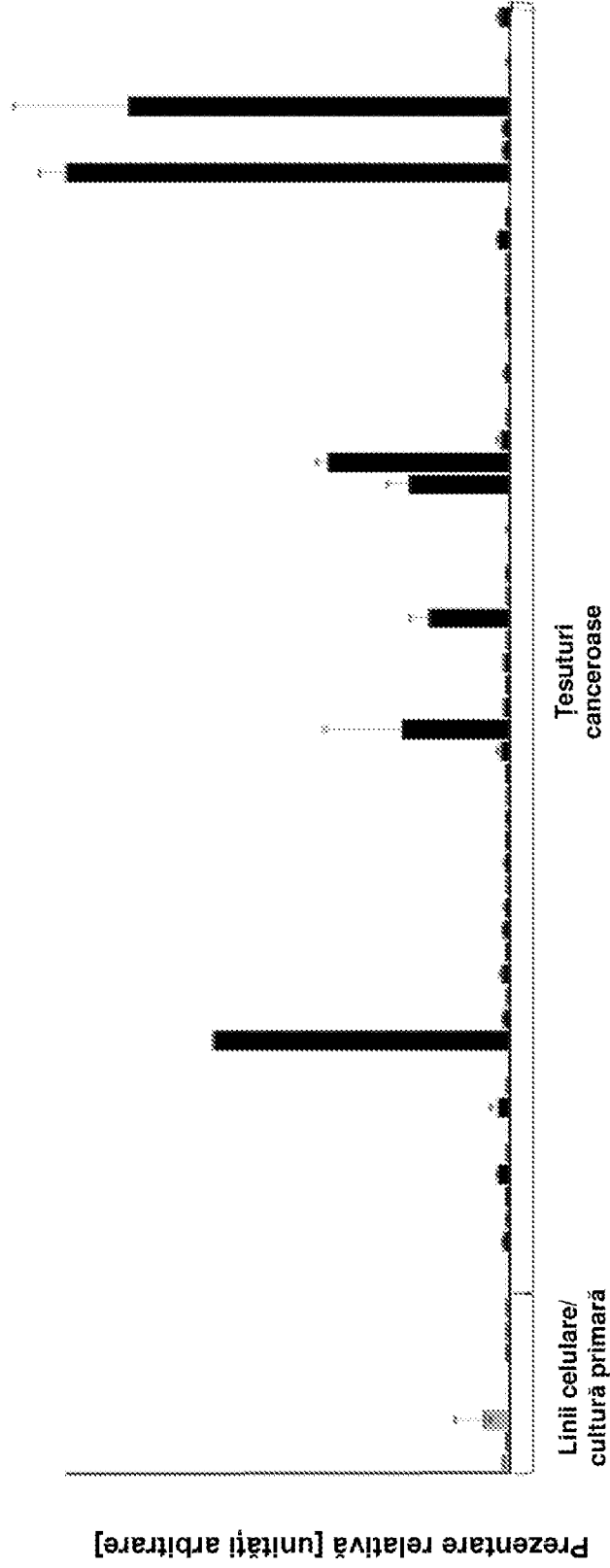


Peptidă detectată pe

3 linii celulare pancreatice, 3 linii celulare cutanate, 1 linie celulară leucocitară, 0 țesuturi normale, 28 țesuturi canceroase (2 cancere cerebrale, 1 cancer de glandă mamară, 1 cancer de colon, 1 cancer esofagian, 2 cancer renal, 1 leucemie, 5 cancere hepatice, 7 cancere pulmonare, 5 cancere ovariene, 1 cancer prostatic, 2 cancere rectale) (de la stânga la dreapta)

Figura 1D

Peptidă: ALIKQLFEA (A\*02)  
SEQ ID NO: 1



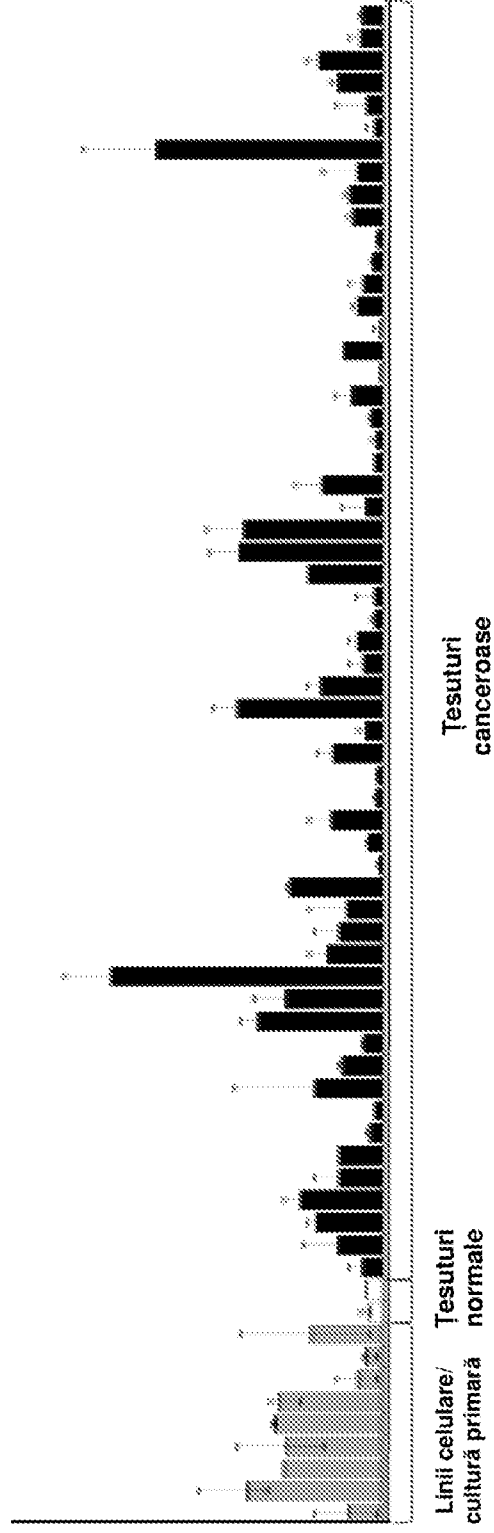
Peptidă detectată pe

7 linii celulare canceroase, 1 cultură primară de celule canceroase, 58 țesuturi canceroase (5 cancere cerebrale, 1 cancer de glandă mamară, 9 cancere de colon, 1 cancer colorectal, 3 cancere esofagiene, 1 cancer de vezică biliară, 2 cancere leucemice leucocitare, 15 cancere pulmonare, 2 cancere de ganglioni limfatici, 1 cancer de celule mioeloide, 5 cancere ovariene, 1 cancer de prostată, 4 cancere rectale, 1 cancer de piele, 2 cancere de stomac, 2 cancere de vezică urinară, 3 cancere uterine) (de la stânga la dreapta)

Figura 1E

Peptidă: FLAELPGSLSL (A\*02)  
SEQ ID NO: 6

Prezentare relativă [unități arbitrare]

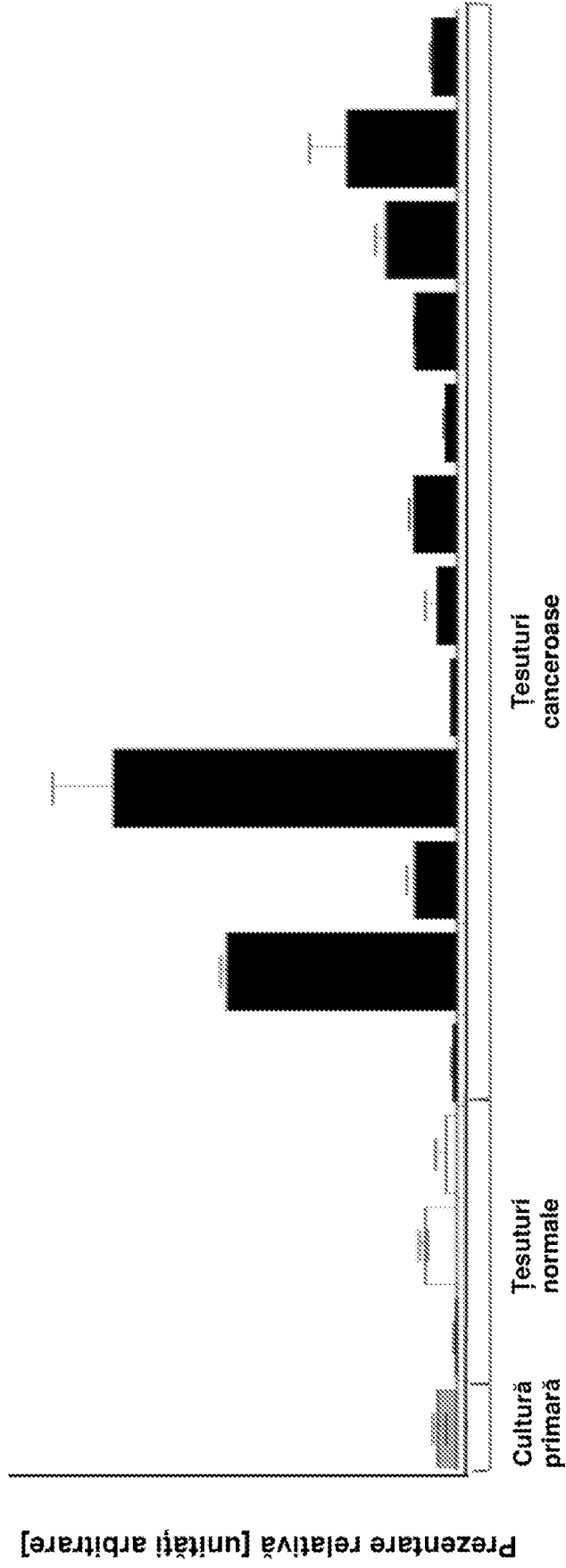


Peptidă detectată pe

8 linii de celule canceroase, 1 cultură de celule canceroase primare, 2 țesuturi normale (1 ganglion limfatic, 1 splină), 57 țesuturi canceroase (1 cancer de măduvă osoasă, 1 cancer de glandă mamară, 1 cancer de cecum, 5 cancer de colon, 2 cancere esofagiene, 1 cancer de vezică biliară, 3 cancere leucemice leucocitare, 2 cancere hepatice, 13 cancere pulmonare, 8 cancere de ganglioni limfatici, 1 cancer de celule mieloidale, 9 cancere ovariene, 2 cancere rectale, 1 cancer de piele, 1 cancer de stomac, 4 cancere de vezică urinară, 2 cancere uterine) (de la stânga la dreapta)

Figura 1F

Peptidă: FLDANGHFV (A\*02)  
SEQ ID NO: 23

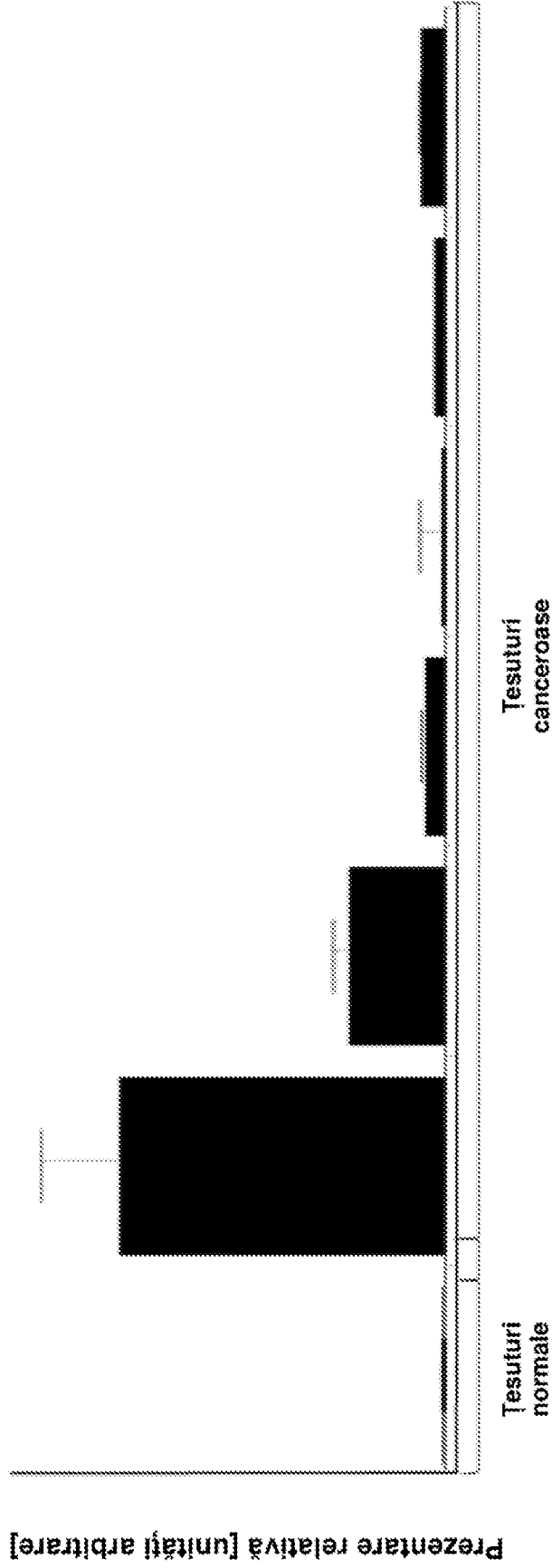


Peptidă detectată pe

1 cultură de celule canceroase primare, 3 țesuturi normale (3 placent), 12 țesuturi canceroase (5 cancere de colon, 1 cancer esofagian, 1 cancer de vezică biliară, 2 cancere de rect, 3 cancere de stomac) (de la stânga la dreapta).

Figura 1G

Peptidă: GLIDEVMVL (A\*02)  
 SEQ ID NO: 22

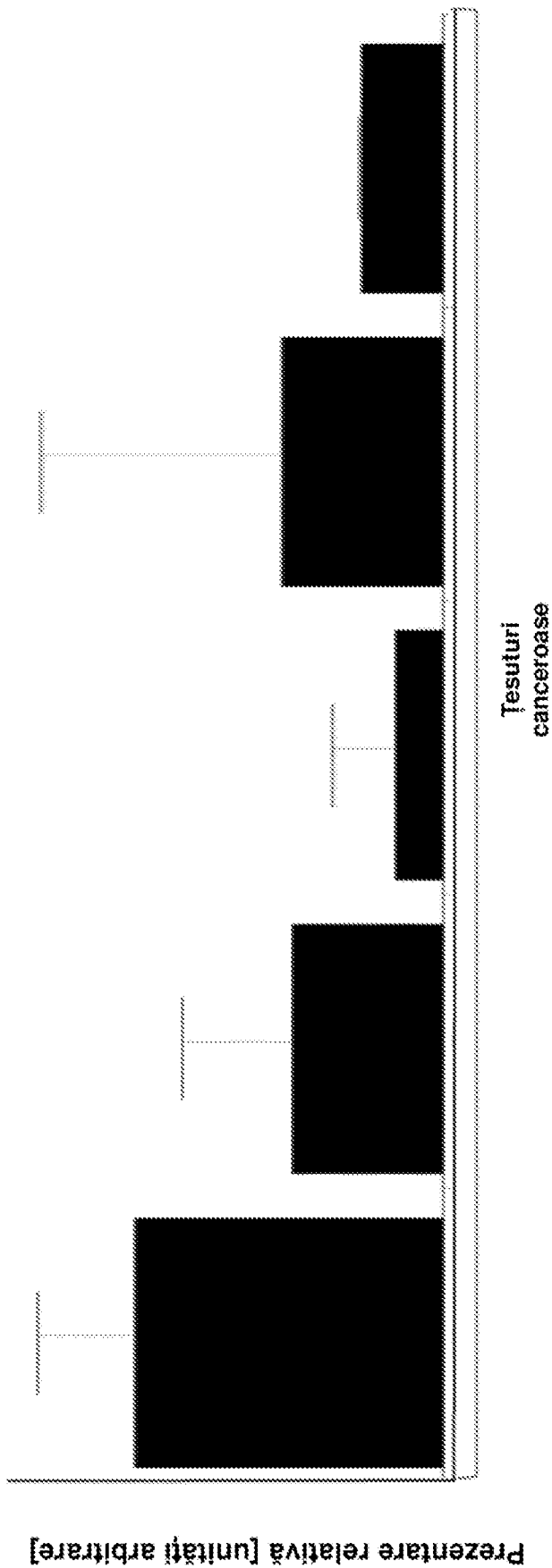


Peptidă detectată pe  
 1 țesut normal (1 stomac), 6 țesuturi canceroase (3 cancere de colon, 1 cancer de vezică biliară, 2 cancere rectale) (de la stânga  
 la dreapta).

Figura 1H

Peptidă: ILDDHLRV (A\*02)

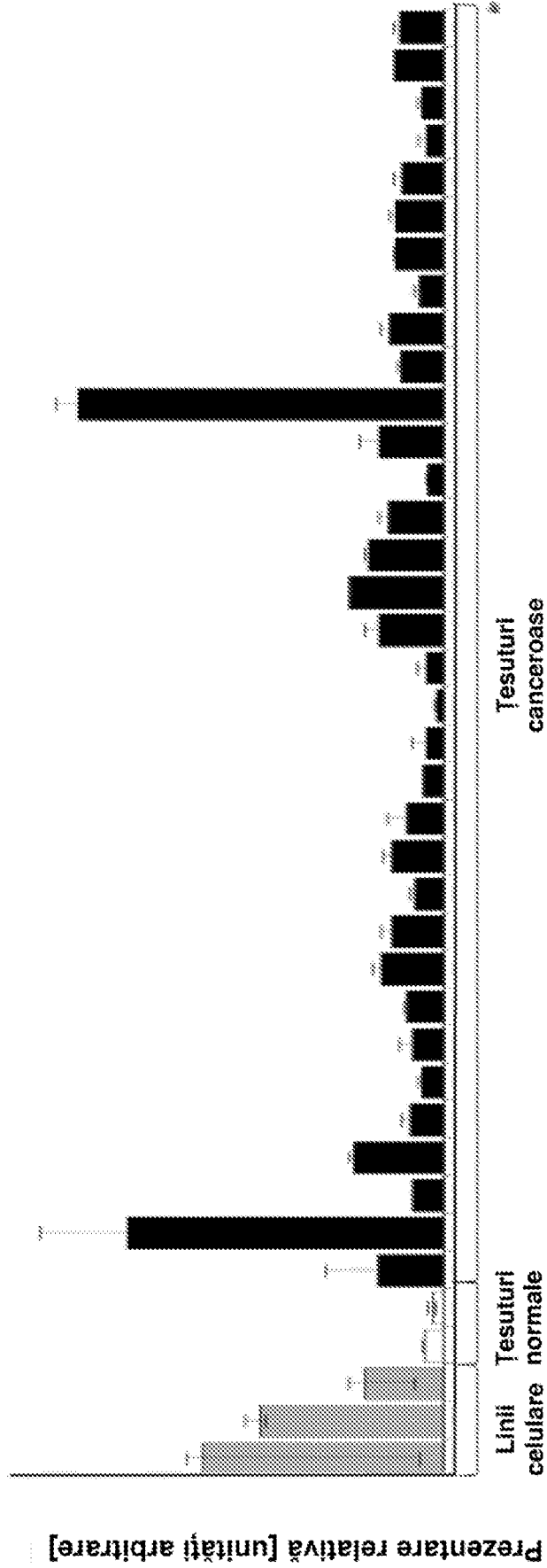
SEQ ID NO: 9



Peptidă detectată pe 5 tesuturi canceroase (1 cancer de cec, 1 cancer de colon, 1 cancer pulmonar, 2 cancer de rect) (de la stânga la dreapta).

Figura 11

Peptidă: KLLAVIHEL (A\*02)  
SEQ ID NO: 152

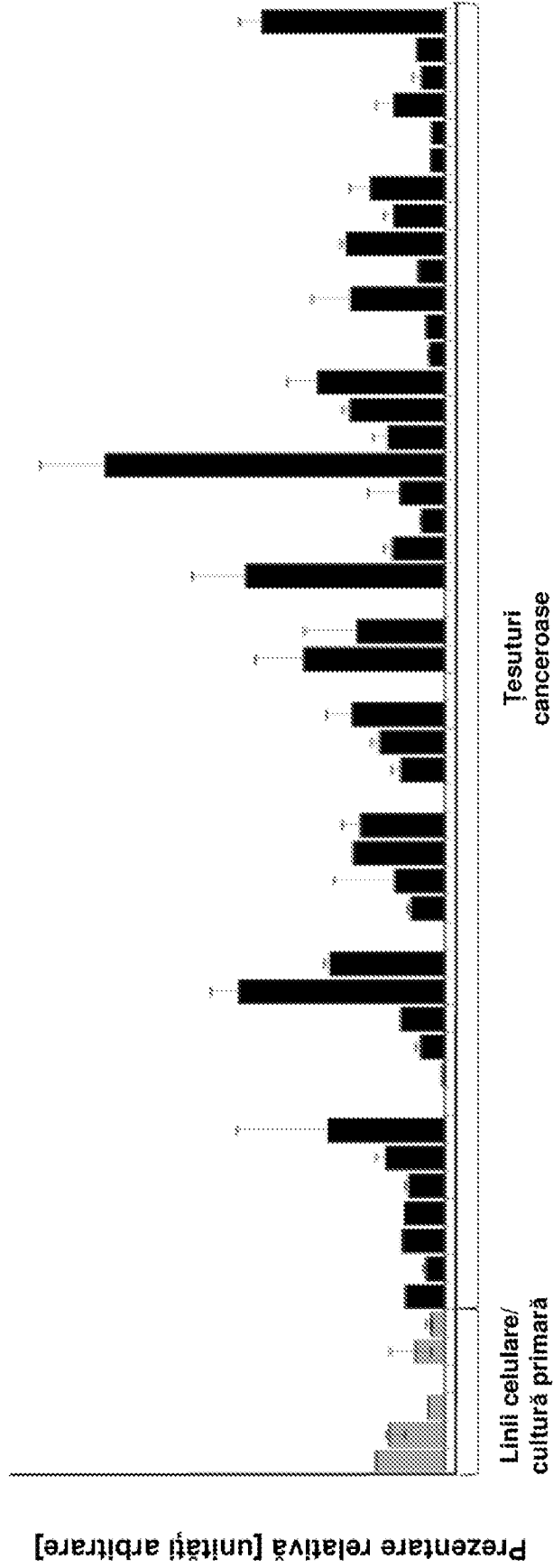


Peptidă detectată pe

3 linii celulare, 2 țesuturi normale (1 ganglion limfatic, 1 splină), 34 țesuturi canceroase (1 cancer de glandă mamară, 7 cancere de colon, 1 cancer de esofag, 1 cancer de vezică biliară, 1 cancer renal, 8 cancere pulmonare, 4 cancere de ganglioni limfatici, 1 cancer de celule mioeloide, 4 cancere ovariene, 1 cancer pancreatic, 1 cancer de rect, 3 cancere de piele, 1 cancer de vezică urinară) (de la stânga la dreapta).

Figura 1J

Peptidă: SLVQRVETI (A\*02)  
SEQ ID NO: 142

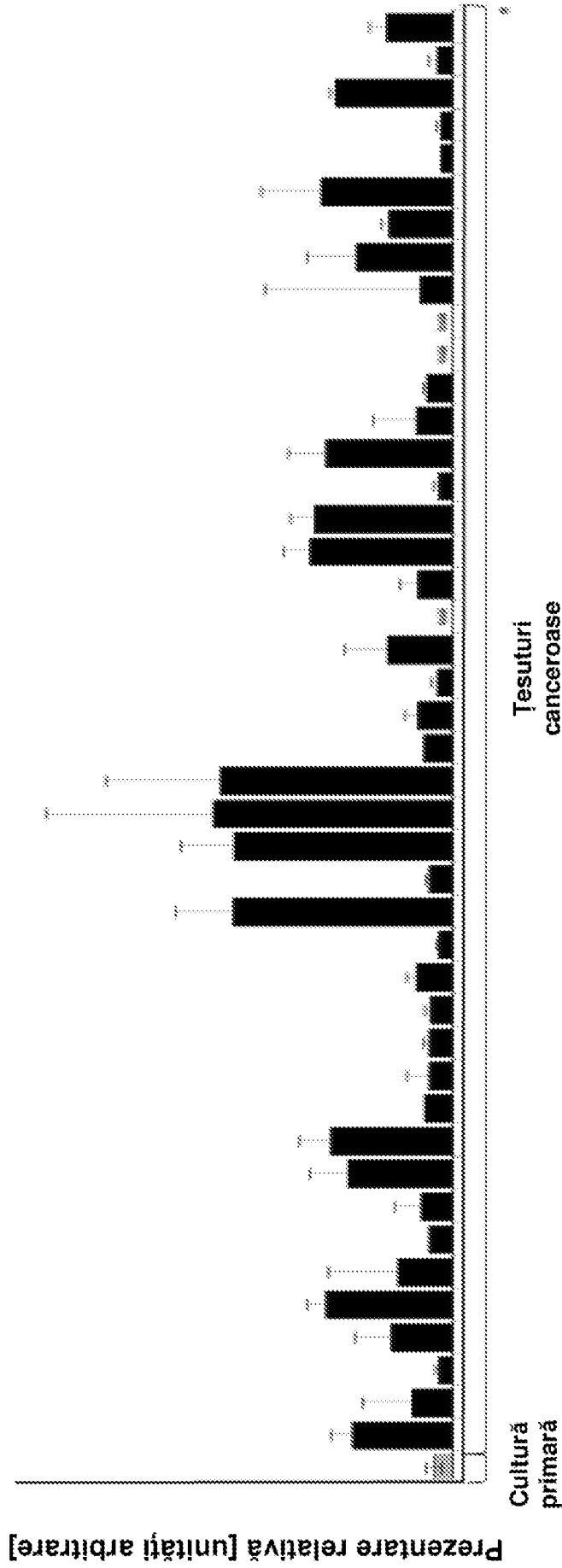


Peptidă detectată pe

5 linii celulare, 1 cultură primară, 47 țesuturi canceroase (2 cancer de cale biliară, 2 cancer de glandă mamară, 1 cancer de cec, 7 cancer de colon, 3 cancer esofagiene, 3 cancer de vezică biliară, 1 cancer renal, 2 cancer hepatic, 10 cancer pulmonare, 2 cancer de stomac, 2 cancer de vezică urinară, 2 cancer uterine) (de la stânga la dreapta).

Figura 1K

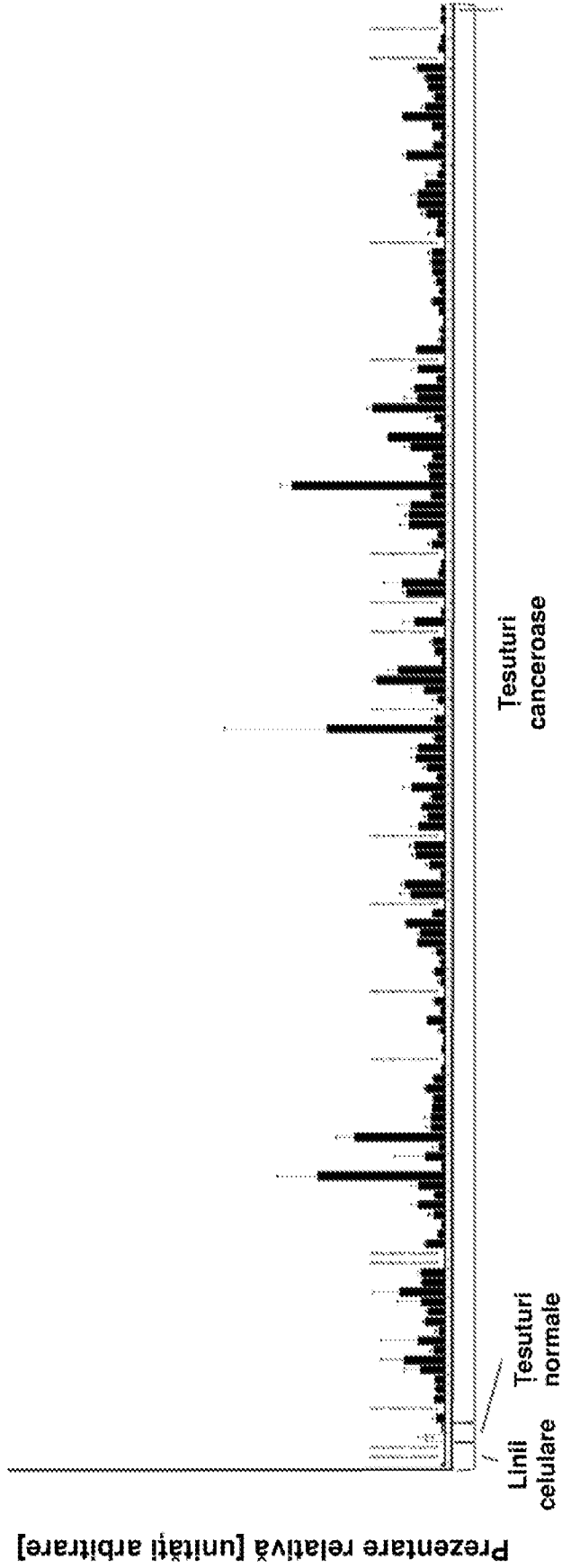
Peptidă: KIQEMQHFL (A\*02)  
SEQ ID NO: 192



Peptidă detectată pe  
1 cultură primară, 44 țesuturi canceroase (5 cancere de colon, 1 cancer esofagian, 1 cancer de vezică biliară, 1 cancer de cap și gât, 30 cancere pulmonare, 1 cancer de ganglioni limfatici, 1 cancer rectal, 1 cancer de stomac, 1 cancer testicular, 1 cancer de vezică urinară, 1 cancer uterin) (de la stânga la dreapta).

Figura 1L

Peptidă: FLLDGSANV (A\*02)  
SEQ ID NO: 212

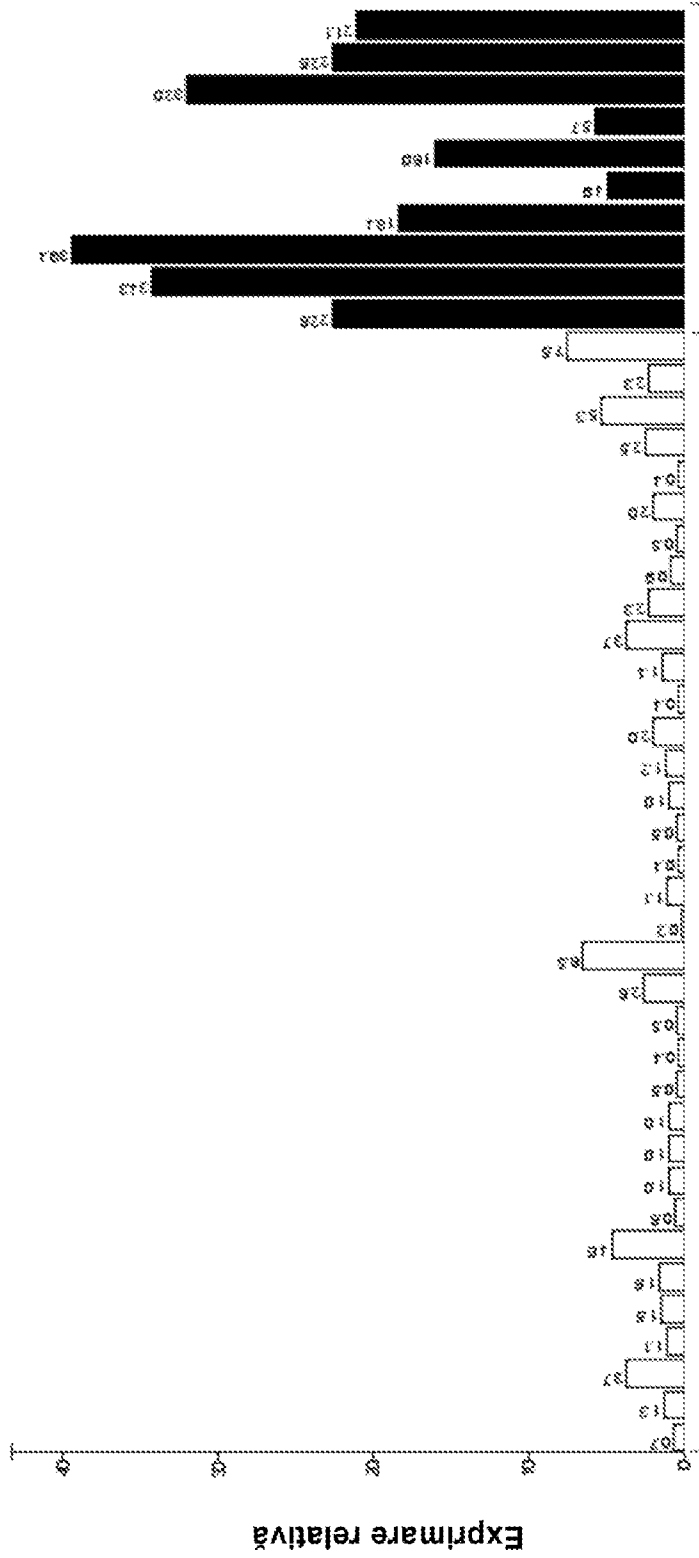


Peptidă detectată pe

3 linii celulare, 2 țesuturi normale (1 placentă, 1 splină), 146 țesuturi canceroase (4 cancere de cale biliară, 13 cancere de glandă mamară, 1 cancer de cec, 8 cancere de colon, 1 cancer colorectal, 6 cancere esofagiene, 5 cancere de vezică biliară, 5 cancere de cap și gât, 2 cancere renale, 1 cancer hepatic, 62 cancere pulmonare, 2 cancere de ganglioni limfatici, 9 cancere ovariene, 7 cancere de pancreas, 3 cancere de rect, 4 cancere de piele, 5 cancere de stomac, 5 cancere de vezică urinară, 3 cancere uterine) (de la stânga la dreapta).

Figura 1M

Genă: CCNB1

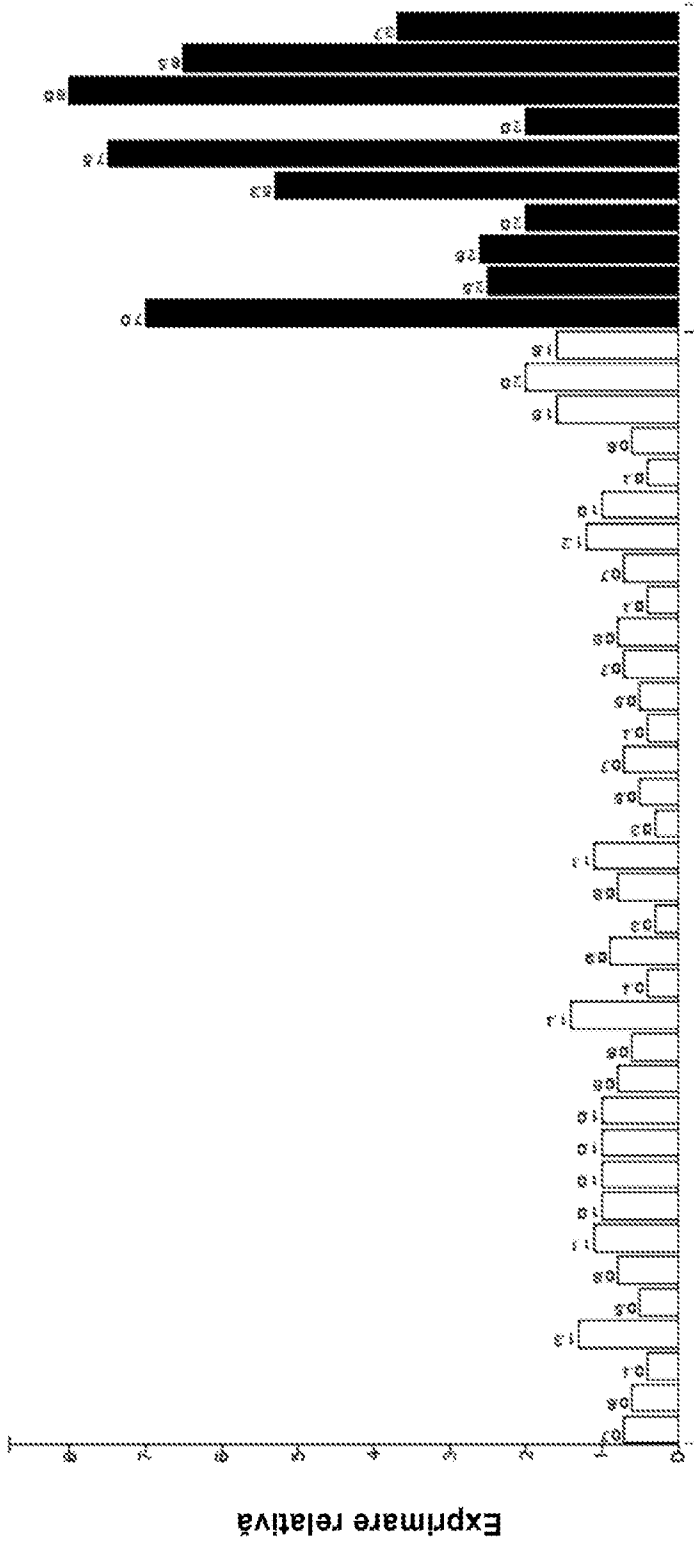


Probe de țesut normal (fiecare probă reprezintă un grup de mai mulți donatori):  
 glandă suprarenală, arteră, măduvă osoasă, creier (întreg), sân, colon, esofag,  
 inimă, rinichi (triplicat), leucocite, ficat, plămâni, ganglion limfatic, ovar,  
 pancreas, placentă, prostată, glandă salivară, mușchi scheletic, piele, intestin  
 subțire, splină, stomac, testicul, timus, glandă tiroidă, vezică urinară, col uterin,  
 uter, venă, 3 probe de colon normal (de la stânga la dreapta)

Figura 2A



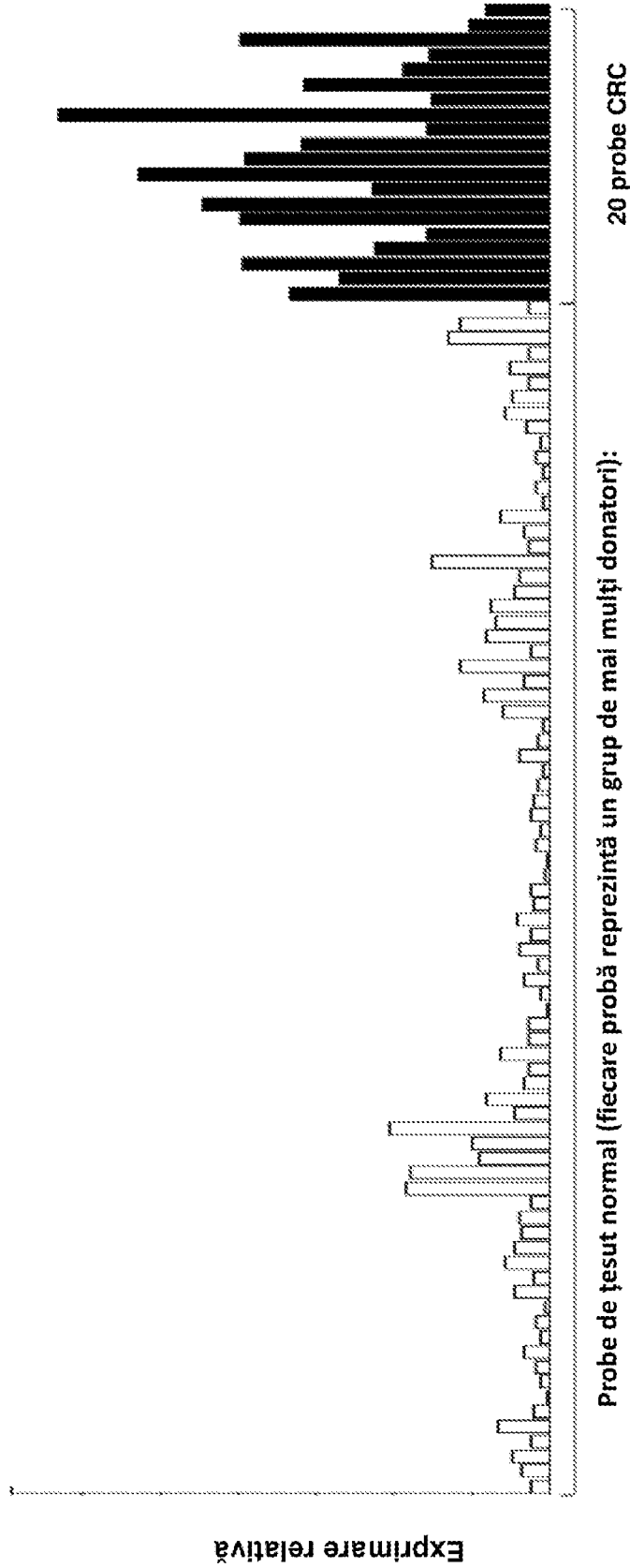
Genă: CHMP5



Probe de țesut normal (fiecare probă reprezintă un grup de mai mulți donatori):  
 glandă suprarenală, arteră, măduvă osoasă, creier (întreg), sân, colon, esofag, inimă,  
 rinichi (triplicat), leucocite, ficat, plămâni, ganglion limfatic, ovar, pancreas,  
 placentă, prostată, glandă salivară, mușchi scheletic, piele, intestin subțire, splină,  
 stomac, testicul, timus, glandă tiroidă, vezică urinară, col uterin, uter, venă, 3 probe  
 de colon normal (de la stânga la dreapta)

Figura 2C

Genă: ECT2  
 (Peptidă: SLVQRVETI, SEQ ID: 142)



Probe de țesut normal (fiecare probă reprezintă un grup de mai mulți donatori):

6 artere, 2 celule sanguine, 2 creiere, 1 inimă, 2 ficăți, 3 plămâni, 2 vene, 1 țesut adipos, 1 glandă suprarenală, 5 măduve osoase, 1 cartilaj, 1 colon, 1 esofag, 2 ochi, 2 vezici biliare, 2 glande salivare, 1 rinichi, 6 ganglioni limfatici, 4 pancreasuri, 2 nervi periferici, 2 glande pituitare, 1 rect, 2 mușchi scheletici, 1 piele, 1 intestin subțire, 1 splină, 1 stomac, 1 glandă tiroidă, 7 trahei, 1 vezică urinară, 1 sân, 5 ovare, 5 placentă, 1 prostată, 1 testicul, 1 timus, 1 uter (de la stânga la dreapta).

Figura 2D

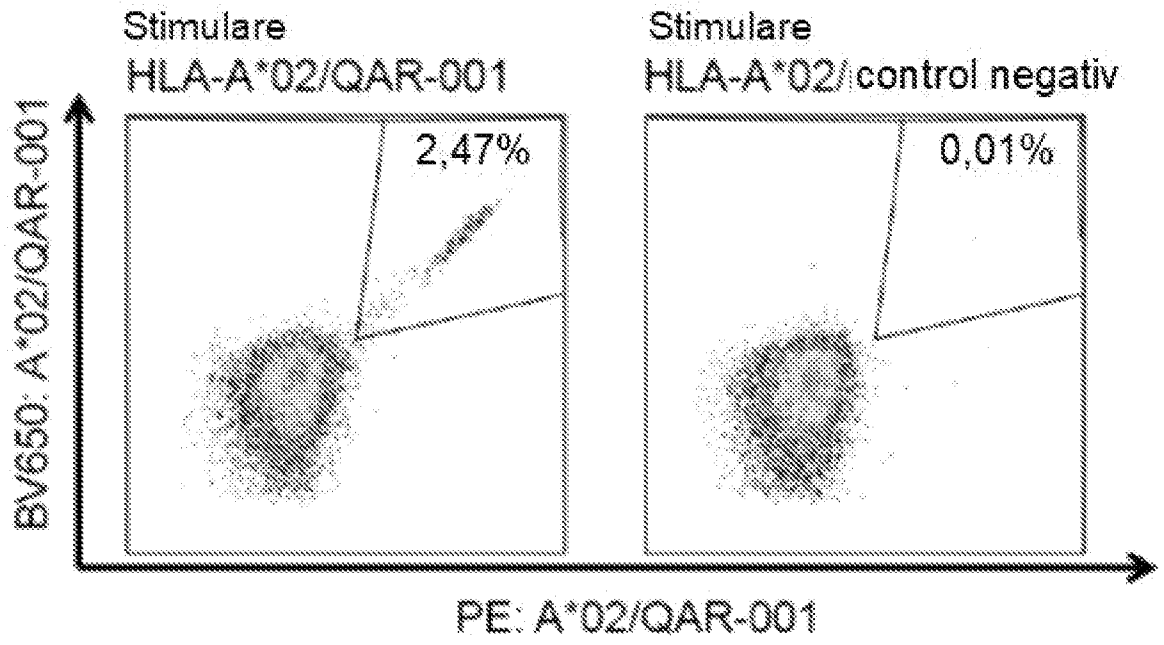


Figura 3

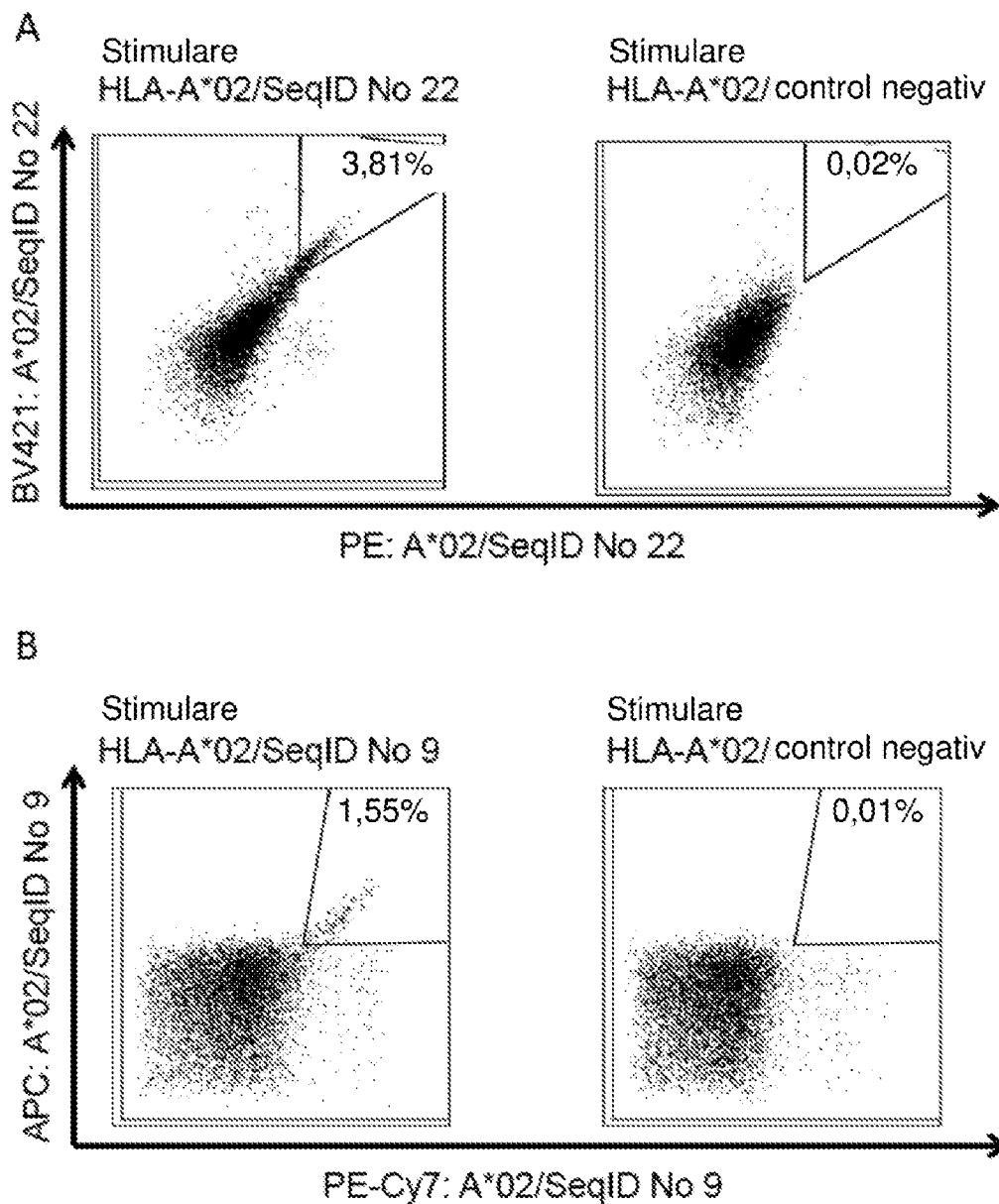


Figura 4

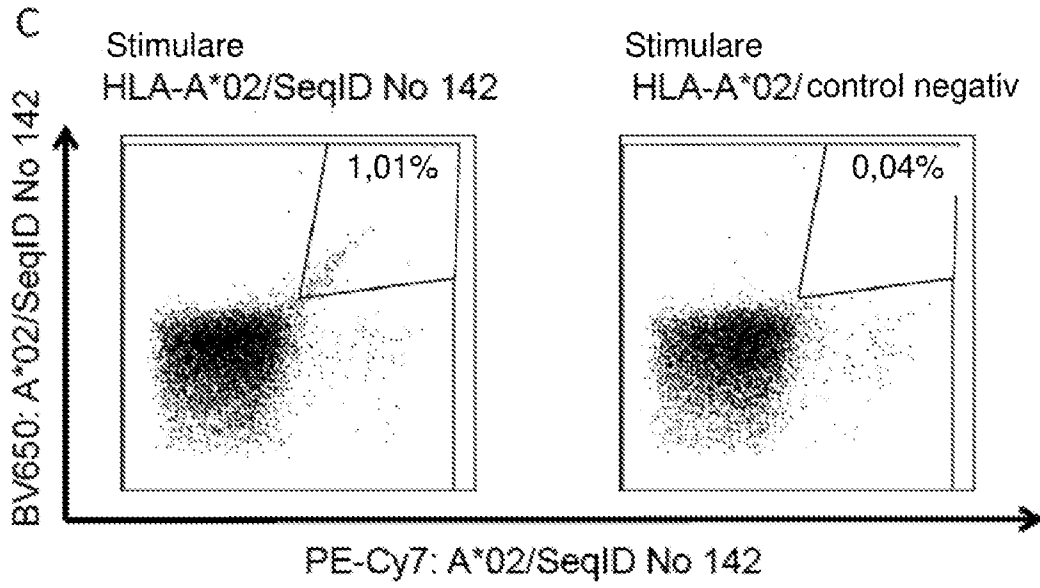


Figura 4 (continuare)