

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034800**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.03.23

(21) Номер заявки
201791519

(22) Дата подачи заявки
2008.07.25

(51) Int. Cl. **C07K 7/06** (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

**(54) ПЕПТИД, СВЯЗЫВАЮЩИЙСЯ С МНС-I, ИНДУЦИРУЮЩИЙ ЦТЛ И
СТИМУЛИРУЮЩИЙ АНТИОПУХОЛЕВЫЕ ИММУННЫЕ ОТВЕТЫ**

(31) 07014797.0; 60/953,161; 08005889.4

(32) 2007.07.27; 2007.07.31; 2008.03.27

(33) EP; US; EP

(43) 2018.03.30

(62) 201000209; 2008.07.25

(56) US-A1-20020146370
WO-A2-2003057823

MEZIERE Chrystelle et al. In Vivo T Helper
Cell Response to Retro-Inverso Peptidomimetics.
The Journal of Immunology, 1997, 159: 3230-3237,
с. 3231

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

(72) Изобретатель:
**Шор Оливер, Хильф Норберт,
Вайншенк Тони, Траутвайн Клаудиа,
Вальтер Штеффен, Сингх Харпрет
(DE)**

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

(57) Изобретение относится к пептиду длиной 9-30 аминокислотных остатков, который способен связываться с молекулой главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) класса I, индуцировать цитотоксические CD8 Т-лимфоциты и стимулировать антиопухолевые иммунные ответы. Также изобретение относится к способу получения указанного пептида; к клетке-хозяину, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую указанный пептид, или вектор, экспрессирующий указанную нуклеиновую кислоту; к активированному ЦТЛ и способу его получения; к применению указанного пептида, указанной клетки-хозяина и активированного ЦТЛ для изготовления лекарственного средства для лечения рака; к применению указанного пептида для получения специфических антител к комплексам МНС/пептид.

034800 B1

034800 B1

Настоящее изобретение относится к пептидам, нуклеиновым кислотам и клеткам для применения в иммунотерапевтических методах. В частности, настоящее изобретение относится к иммунотерапии рака. Настоящее изобретение относится в дальнейшем к опухолеассоциированным пептидным эпитопам цитотоксических Т-клеток (ЦТЛ) в отдельности или в комбинации с другими опухолеассоциированными пептидами, которые служат как активные фармацевтические ингредиенты для композиций вакцины, которая стимулирует антиопухолевые иммунные ответы. Настоящее изобретение относится к 11 новым пептидным последовательностям и их вариантам, образованным из молекул HLA класса I и II человеческих опухолевых клеток, которые могут быть использованы в вакцинных композициях для вызывания противоопухолевых иммунных ответов.

Уровень техники

Глиомы являются опухолями головного мозга, возникающими из глиальных клеток нервной системы. Глиальные клетки, называемые обычно нейроглиа или просто глия, являются не-нейрональными клетками, которые обеспечивают поддержку и питание, поддерживают гомеостаз, формируют миелин и участвуют в передаче сигналов в нервной системе. Две наиболее важные подгруппы глиом - это астроцитомы и олигодендроглиомы, называемые в соответствии с видами нормальных глиальных клеток, из которых они образуются (астроциты или олигодендроциты соответственно). Относящаяся к подгруппе астроцитом мультиморфная глиобластома (называемая далее глиобластомой) является наиболее распространенной злокачественной опухолью головного мозга взрослых людей и на ее счет приходится приблизительно 40% всех злокачественных опухолей головного мозга и приблизительно 50% глиом (CBTRUS, 2006). Она агрессивно поражает центральную нервную систему и имеет наивысший уровень злокачественности (степень IV) среди всех глиом. Хотя наблюдается постоянный прогресс в их лечении благодаря усовершенствованию нейровизуализации, микрохирургии, различным возможностям лечения, таким как темозоломид и облучение, глиобластомы остаются неизлечимыми (Macdonald, 2001; Burton and Prados, 2000; Prados and Levin, 2000). Процент летальных исходов при этой опухоли головного мозга очень высок: средняя ожидаемая продолжительность жизни после постановки первого диагноза составляет 9-12 месяцев. 5-летний срок выживаемости с 1986 по 1990 составил 8,0%. На данный момент пятилетний срок выживаемости вследствие агрессивной терапии, включая макроскопическое удаление опухоли, все еще ниже 10% (Burton and Prados, 2000; Nieder et al., 2000; Napolitano et al., 1999; Dazzi et al., 2000). Соответственно существует высокая потребность медицины в альтернативном и эффективном методе лечения.

Опухолевые клетки глиобластомы являются наиболее недифференцированными среди опухолей головного мозга, так что опухолевые клетки имеют высокий потенциал для миграции и пролиферации и являются высокоинвазивными, приводя к очень неутешительному прогнозу. Глиобластомы приводят к смерти из-за быстрого, агрессивного и инфильтрирующего роста в головном мозге. Паттерны инфильтрирующего роста ответственны за нерезектабельную природу этих опухолей. Глиобластомы также относительно резистентны к облучению и химиотерапии, и поэтому высок процент рецидивов после лечения. Кроме того, иммунный ответ на неопластические клетки довольно неэффективен для полного устранения всех неопластических клеток после резекции и лучевой терапии (Roth and Weller, 1999; Dix et al., 1999; Sablotzki et al., 2000).

Глиобластома подразделяется на первичную глиобластома (de novo) и вторичную глиобластома в зависимости от различий в генном механизме во время злокачественной трансформации недифференцированных астроцитов или глиальных клеток-предшественников. Вторичная глиобластома возникает в более молодом возрасте, до 45 лет. В течение 4-5 лет, в среднем, вторичная глиобластома развивается из астроцитомы низкой степени, проходя стадию недифференцированной астроцитомы. Первичная глиобластома, напротив, возникает в более пожилом возрасте, в среднем это 55 лет. В целом, первичная глиобластома возникает как молниеносная глиобластома, характеризуясь прогрессирующим опухолью в течение 3 месяцев, начиная с состояния без клинических или патологических отклонений (Pathology and Genetics of the Nervous Systems. 29-39 (IARC Press, Lyon, France, 2000)).

Глиобластома мигрирует вдоль миелинизированных нервов и широко распространяется по центральной нервной системе. В большинстве случаев хирургическое вмешательство дает лишь ограниченно устойчивый терапевтический эффект (Neurol. Med Chir. (Tokyo) 34, 91-94, 1994; Neurol. Med Chir. (Tokyo) 33, 425-458, 1993; Neuropathology 17, 186-188, 1997) (Macdonald, 2001; Prados and Levin, 2000).

Злокачественные клетки глиомы ускользают от обнаружения иммунной системой хозяина за счет выработки иммуноподавляющих веществ, которые наносят вред пролиферации Т-клеток и выработке иммуностимулирующего цитокина ИЛ-2 (Dix et al., 1999).

Внутричерепные неоплазмы могут возникнуть из любых структур или видов клеток, присутствующих в ЦНС, включая головной мозг, мягкие мозговые оболочки, мозговой придаток, череп и даже остаточную эмбриональную ткань. Общая ежегодная частота заболеваемости первичными опухолями головного мозга в Соединенных Штатах составляет 14 случаев на 100000. Наиболее распространенные первичные опухоли головного мозга - менингиомы, составляющие 27% всех первичных опухолей головного мозга, и глиобластомы, составляющие 23% всех первичных опухолей головного мозга (причем на счет глиобластомы приходится 40% случаев злокачественных опухолей головного мозга взрослого населе-

ния). Многие из этих опухолей агрессивны и имеют высокую степень злокачественности. Первичные опухоли головного мозга являются наиболее распространенными солидными опухолями у детей и второй по частоте причиной смерти от рака после лейкемии у детей.

Поиск эффективного лечения пациентов от глиобластом продолжается и сейчас. Была изучена иммунотерапия, или лечение посредством стимуляции иммунной системы, в целях борьбы с данными неопластическими клетками. Первые обнадеживающие результаты были получены из иммунотерапевтических исследований на человеческих пациентах, в которых могли быть индуцированы антигенспецифические ответы ЦТЛ, приводившие к увеличению средних сроков выживаемости в сравнении с теми, что были получены с применением стандартного лечения, сопровождаемого минимальной токсичностью (Heimberger et al., 2006).

Проблемой, решенной предлагаемой заявкой, была, таким образом, разработка новой эффективной и безопасной возможности лечения опухолей головного мозга и улучшение самочувствия пациентов без применения химиотерапевтических веществ или же других веществ, которые могут вызывать серьезные побочные эффекты.

Краткое описание принципа изобретения

Все термины, используемые здесь, если не указано иное, имеют значения, данные ниже.

Термин "пептид" используется здесь для обозначения серий аминокислотных остатков, связанных друг с другом типично пептидными связями между альфа-аминными и карбонильными группами смежных аминокислот. Пептиды типично обладают длиной в 9 аминокислот, но могут быть короче - 8 аминокислот в длину и длиннее - 14 аминокислот в длину.

Термин "олигопептид" используется здесь для обозначения серий аминокислотных остатков, связанных один с другим типично пептидными связями между альфа-аминными и карбонильными группами смежных аминокислот. Длина олигопептида не особенно важна для изобретения до тех пор, пока в нем сохраняются надлежащие эпитоп или эпитопы. Олигопептиды типично бывают менее чем около 30 аминокислотных остатков в длину и более чем около 14 аминокислот в длину.

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

Пептид, олигопептид, белок или полинуклеотид, кодирующий для такой молекулы, является "иммуногенным" (и, таким образом, "иммуногеном" в рамках настоящего изобретения), если он способен индуцировать иммунный ответ. В случае настоящего изобретения иммуногенность получает более специфическое определение как способность индуцировать опосредованную ЦТЛ реакцию. Таким образом, "иммуноген" должен представлять собой молекулу, которая способна индуцировать иммунный ответ, и, в случае настоящего изобретения, молекулу, способную индуцировать ответ ЦТЛ.

Т-клеточный "эпитоп" - это короткая пептидная молекула, которая связывается с молекулой МНС I или II класса и которая впоследствии распознается Т-клеткой. Т-клеточные эпитопы, которые связываются с молекулами МНС I класса, типично имеют длину в 8-14 аминокислот и, особенно типично, длину в 9 аминокислот. Т-клеточные эпитопы, которые связываются с молекулами МНС II класса, типично имеют длину в 12-30 аминокислот. В случае эпитопов, которые связываются с молекулами МНС II класса, одинаковые Т-клеточные эпитопы могут иметь общий центральный сегмент, но различаться по длине карбокси- и аминотерминальных примыкающих последовательностей вследствие того факта, что концы пептидной молекулы не углублены в структуру пептидсвязывающей бороздки молекулы МНС II класса, как то имеет место быть с пептидсвязывающей бороздкой молекулы МНС I класса.

Существуют три различных генетических локуса, которые кодируют для молекул МНС I класса: HLA-A, HLA-B и HLA-C. HLA-A1, HLA-A2 и HLA-A11 являются примерами различных молекул МНС I класса, которые могут экспрессироваться из этих локусов.

Используемая здесь ссылка на последовательность ДНК включает как однонитевую, так и двухнитевую ДНК. Таким образом, специфическая последовательность, если в контексте не указано иное, относится к однонитевой ДНК такой последовательности, дуплексу такой последовательности с его комплементом (двухнитевая ДНК) и комплементу такой последовательности. Термин "кодирующая область" относится к тому участку гена, который естественно или нормально кодирует для экспрессионного продукта того гена в его естественном геномном окружении, т.е. участку, кодирующему *in vivo* для нативного продукта экспрессии гена.

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

Термин "нуклеотидная последовательность" относится к гетерополимеру дезоксирибонуклеотидов.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая для конкретного пептида, олигопептида или полипептида, может быть встречающейся в природе или может быть получена синтетически. В целом, фрагменты ДНК, кодирующие пептиды, полипептиды и белки данного изобретения, собраны из фрагментов

кДНК и коротких олигонуклеотидных линкеров или же из серий олигонуклеотидов для обеспечения синтетического гена, который способен экспрессироваться в рекомбинантной транскрипционной единице, включающей регуляторные элементы, образованные из микробного или вирусного оперона.

Термин "продукт экспрессии" означает полипептид или белок, являющийся естественным продуктом трансляции гена и кодирующих эквивалентов любой последовательности нуклеиновой кислоты, образующихся в результате вырожденности генетического кода и, таким образом, кодирующих для той/тех же самой(ых) нуклеиновой(ых) кислот(ы).

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

Термин "фрагмент ДНК" относится к полимеру ДНК в виде отдельного фрагмента или в качестве компонента более крупной конструкции ДНК, которая была образована из ДНК, изолированной по крайней мере один раз в существенно чистой форме, т.е. без контаминирующих эндогенных материалов и в количестве или с концентрацией, позволяющей идентификацию, манипуляцию и получение фрагмента и его составных нуклеотидных последовательностей стандартными биохимическими методами, например с использованием вектора для клонирования. Такие фрагменты обеспечиваются в форме открытой рамки считывания, не прерываемой внутренними нетранслированными последовательностями или интронами, которые типично присутствуют в эукариотических генах. Последовательности нетранслированной ДНК могут быть представлены по ходу транскрипции из открытой рамки считывания, где она не интерферирует с манипуляцией или экспрессией кодирующих областей.

Термин "праймер" означает короткую последовательность нуклеиновой кислоты, которая может быть спарена с одной нитью ДНК и обеспечивает свободный конец 3'ОН, на котором ДНК-полимераза начинает синтезировать дезоксирибонуклеотидную цепь.

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

Понятие "изолированный" означает, что материал удален из его исходного окружения (к примеру, естественное окружение, если он встречается в природе). Например, встречающийся в природе полинуклеотид или полипептид, представленный в живых организмах, не является изолированным, но тот же самый полинуклеотид или полипептид, выделенный из некоторых или всех сосуществующих материалов природной системы, является изолированным. Такие полинуклеотиды могли быть частью вектора и/или такие полинуклеотиды или полипептиды могли быть частью композиции и все-таки могли быть изолированы, так что такой вектор или композиция не является частью своего естественного окружения.

Полинуклеотиды и рекомбинантные или иммуногенные полипептиды, раскрытые в соответствии с настоящим изобретением, могут также быть в "очищенной" форме. Термин "очищенный" не требует абсолютной чистоты; скорее он предназначен для дачи относительного определения и может включать препараты с высокой очисткой или препараты только с частичной очисткой, в соответствии с тем, как эти термины понимаются специалистами соответствующей области. Например, отдельные клоны, изолированные из библиотеки кДНК, обычно очищались до электрофоретической чистоты. Очистка исходного материала или природного материала по крайней мере до одного порядка величины, предпочтительно двух или трех порядков и более предпочтительно четырех или пяти порядков величины определено рассматривается. Более того, определено рассматривается заявленный полипептид, чистота которого составляет предпочтительным образом 99,999 вес.% или по крайней мере 99,99 или 99,9 вес.% и еще более желательно 99 вес.% или более.

Нуклеиновые кислоты и продукты экспрессии полипептида, раскрываемые в соответствии с настоящим изобретением, в равной степени, как и векторы экспрессии, содержащие такие нуклеиновые кислоты и/или такие полипептиды, могут быть в "обогащенной форме". Используемый здесь термин "обогащенный" означает, что концентрация материала по крайней мере в приблизительно 2, 5, 10, 100 или 1000 раз выше его естественной концентрации (например), преимущественно 0,01 вес.%, предпочтительно по крайней мере около 0,1 вес.%. Рассматриваются также препараты с около 0,5, 1, 5, 10 и 20 вес.%. Последовательности, конструкции, векторы, клоны и другие материалы, включенные в настоящее изобретение, могут предпочтительно быть в обогащенной или изолированной форме.

Термин "активный фрагмент" означает фрагмент, который дает иммунный ответ (т.е. обладает иммуногенной активностью), если он введен отдельно или опционально с подходящим адьювантом животному, такому как млекопитающее, например кролику или мыши, также включая человека; таковой иммунный ответ, принимающий форму стимуляции ответа ЦТЛ у животного-реципиента, такого как человек. Альтернативно "активный фрагмент" может также быть использован для инициации ответа ЦТЛ *in vitro*.

Используемые здесь термины "участок", "сегмент" и "фрагмент", если они использованы по отношению к полипептидам, относятся к непрерывной последовательности остатков, таких как аминокислотные остатки, последовательность которых формирует подкласс более крупной последовательности. Например, если полипептид был подвергнут обработке любой из известных эндопептидаз, таких как трип-

син или химотрипсин, то полученные в результате такой обработки олигопептиды будут представлять участки, сегменты или фрагменты исходного полипептида. Это означает, что любой таковой фрагмент будет обязательно содержать как часть его аминокислотной последовательности сегмент, фрагмент или участок, который в значительной степени идентичен, если не в точности идентичен последовательности с SEQ ID № 1 по 11, которая соответствует встречающимся в природе или "материнским" белкам последовательностей с SEQ ID № 1 по 11. При использовании по отношению к полинуклеотидам такие термины относятся к продуктам, полученным при обработке указанных полинуклеотидов любой из известных эндонуклеаз.

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

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

где С является числом различий между контрольной последовательностью и сравниваемой последовательностью по длине противопоставления между контрольной последовательностью и сравниваемой последовательностью, где

(i) каждое основание или аминокислота в контрольной последовательности, которые не имеют соответствующего противопоставленного основания или аминокислоты в сравниваемой последовательности, и

(ii) каждая брешь в контрольной последовательности и

(iii) каждое противопоставленное основание или аминокислота в контрольной последовательности, которые отличаются от противопоставленного основания или аминокислоты в сравниваемой последовательности, представляют собой различие;

и R - это число оснований или аминокислот в контрольной последовательности по длине противопоставления сравниваемой последовательности с любой брешью, образующейся в контрольной последовательности, считающейся также за основание или аминокислоту.

Если существует противопоставление между сравниваемой последовательностью и контрольной последовательностью, для которых процентная доля идентичности по расчетам выше имеет значение приблизительного равенства или "более чем" установленной минимальной процентной доли идентичности, тогда сравниваемая последовательность имеет установленную минимальную процентную долю идентичности с контрольной последовательностью, если даже могут существовать противопоставления, в которых подсчитанная здесь выше процентная доля идентичности меньше, чем установленная процентная доля идентичности.

Исходные пептиды, раскрываемые здесь, могут быть модифицированы путем замещения одного или нескольких остатков в различных по возможности отобранных местах по длине пептидной цепи, если не заявлено иное. Такие замещения могут носить консервативный характер, например, где одна аминокислота заменяется аминокислотой с похожей структурой и характеристиками, так же как при замене гидрофобной аминокислоты, на другую гидрофобную аминокислоту. Еще более консервативным будет замещение аминокислот одинакового или похожего размера и химического характера, такое как при замене лейцина на изолейцин. В исследованиях вариаций последовательностей внутри семейств встречающихся в природе гомологичных белков определенные замещения аминокислот переносятся гораздо чаще, чем другие, и они часто проявляют взаимосвязь со сходствами по размеру, заряду, полярности и гидрофобности между исходной аминокислотой и ее заменой; и таковой является основа определения "консервативных замещений".

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

Менее консервативные замещения могут охватывать замещение одной аминокислоты другой, имеющей похожие характеристики, но отличающейся в какой-то степени по размеру, как в случае замещения аланина остатком изолейцина. Высоконеконсервативные замещения могут охватывать замещение кислой аминокислоты другой, которая имеет полярность, или даже такой, которая имеет щелочной характер. Такие "радикальные" замещения не могут, однако, быть отвергнуты как потенциально неэффективные из-за того, что химические эффекты не полностью предсказуемы, и радикальные замещения могут привести к увеличению случайных эффектов, в противном случае не предсказуемых, исходя из обычных химических принципов.

Разумеется, в таких замещениях могут участвовать другие структуры, отличающиеся от обычных L-аминокислот. Таким образом, D-аминокислоты могут быть замещены L-аминокислотами, обычно встречающимися в антигенных пептидах по изобретению и также охватываемыми настоящим раскрыти-

ем сущности изобретения. Кроме того, аминокислоты, содержащие нестандартные R-группы (т.е. R-группы, отличающиеся от обнаруженных в распространенных 20 аминокислотах природных белков), могут быть также использованы в целях замещения для получения иммуногена и иммуногенных полипептидов в соответствии с настоящим изобретением.

Если были произведены замещения на более чем одной позиции для получения пептида с практически эквивалентной или большей антигенной активностью, чем та, что определена ниже, то комбинации таких замещений будут проанализированы для определения того, приведут ли эти комбинации замещений к дополнительным или синергетическим эффектам по отношению к антигенности пептида. По большей части не более 4 позиций внутри пептида должны замещаться одновременно.

Термин "Т-клеточный ответ" означает специфическую пролиферацию и активацию эффекторных функций, индуцированных пептидом *in vitro* или *in vivo*. Для ЦТЛ, рестриктированных по МНС класса I, эффекторными функциями может быть лизис клеток-мишеней с введенным импульсным способом пептидом, с введенным импульсным способом предшественником пептида или клеток-мишеней, естественно презентирующих пептид, секреция цитокинов, предпочтительно интерферона-гамма, TNF-альфа или ИЛ-2, индуцированная пептидом, секреция эффекторных молекул, предпочтительно гранзимов или перфоринов, индуцированная пептидом, или дегрануляция. Для Т-хелперных клеток, рестриктированных по МНС класса II, эффекторными функциями может быть индуцированная пептидом секреция цитокинов, предпочтительно IFN-гамма, TNF-альфа, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10 или ИЛ-2, или индуцированная пептидом дегрануляция. Возможные эффекторные функции ЦТЛ и Т-хелперных клеток не ограничиваются данным списком.

Основываясь на цитотоксических анализах, эпитоп считается, по существу, идентичным контрольному пептиду, если он имеет по крайней мере 10% антигенной активности контрольного пептида, как-то определено способностью замещенного пептида восстанавливать эпитоп, распознанный ЦТЛ, в сравнении со контрольным пептидом. Таким образом, при сравнении лизирующей активности на линейном участке кривой эффектор/мишень с эквимоллярными концентрациями сравниваемого и замещенного пептидов наблюдаемое процентное соотношение специфического уничтожения клеток-мишеней, инкубированных с замещенным пептидом, должно быть равным показателю контрольного пептида в соотношении эффектор/мишень, который не выше чем в 10 раз, чем соотношение эффектор/мишень контрольного пептида, по которому было произведено сравнение.

Предпочтительно, если ЦТЛ, специфичные для пептида с SEQ ID № 1 по SEQ ID № 11, протестированы на замещенные пептиды; концентрация пептида, при которой замещенные пептиды достигают половины максимального роста лизиса относительно фона, составляет не более чем около 1 мМ, предпочтительно не более чем около 1 мкМ, более предпочтительно не более чем около 1 нМ и еще более предпочтительно не более чем около 100 пМ и, наиболее предпочтительно не более чем около 10 пМ. Также предпочтительно, чтобы замещенный пептид распознавался ЦТЛ более чем одного индивида, по крайней мере, двух и более предпочтительно трех индивидов.

Таким образом, эпитопы настоящего изобретения могут быть идентичны встречающимся в природе опухолеассоциированным или опухолеспецифическим эпитопам или могут включать эпитопы, отличающиеся не более чем 4 остатками от контрольного пептида, при условии, что они имеют, по существу, идентичную антигенную активность.

Стимуляция иммунных ответов зависит от присутствия антигенов, распознающихся иммунной системой хозяина как чужеродные. Открытие существования опухолеассоциированных антигенов сейчас улучшило возможности для использования иммунной системы хозяина для способствования иммунному ответу, специфическому для антигенов-мишеней, экспрессированных на поверхности опухолевых клеток, который благодаря данному механизму действия способен вызывать регрессию, задержку или замедление роста опухоли. Различные механизмы объединения обеих ветвей иммунной системы, как гуморальной, так и клеточной, исследуются в настоящее время для иммунотерапии рака.

Специфические элементы клеточных иммунных ответов способны к специфическому распознаванию и уничтожению опухолевых клеток. Изоляция цитотоксических Т-клеток (ЦТЛ) из популяций опухолинфильтрирующих клеточных популяций или из периферической крови предполагает, что такие клетки играют важную роль в естественной иммунной защите против рака (Cheever et al., 1993; Zeh, III et al., 1999). Основываясь на 415 тканевых препаратах пациентов, страдающих от колоректального рака, Galon и соавторы были в состоянии продемонстрировать, что вид, плотность и местонахождение иммунных клеток в опухолевой ткани являются действительно лучшим прогностическим фактором выживаемости пациентов, чем широко используемая классификация опухолей по TNM (Galon et al., 2006). В частности, CD8-положительные Т-клетки (TCD8⁺), которые распознают молекулы I класса главного комплекса гистосовместимости (МНС) с пептидами, имеющими обычно 8-10 аминокислотных остатков, образованных из белков, дефектных рибосомных продуктов (DRIPs) (Schubert et al., 2000), играют важную роль в этом ответе. Пептиды, образованные из сплайсированных форм белков, также описаны в литературе. Молекулы МНС человека называются также человеческими лейкоцитарными антигенами (HLA).

Существуют два класса молекул МНС: молекулы МНС I класса, встречающиеся на большинстве клеток, имеющих ядро. Молекулы МНС состоят из альфа-тяжелой цепи и бета-2-микроглобулина (ре-

цепторы МНС класса I) или альфа- и бета-цепи (рецепторы МНС класса II) соответственно. Их трехмерная форма образует связывающую бороздку, которая используется для нековалентного взаимодействия с пептидами. МНС класса I презентируют пептиды, образующиеся из протеолитического расщепления преимущественно эндогенных белков, DRIPs и более крупных пептидов. Молекулы МНС II класса могут встречаться преимущественно на профессиональных антигенпрезентирующих клетках (АПК) и, в первую очередь, презентировать пептиды экзогенных или трансмембранных белков, которые поглощаются АПК в период эндоцитоза и впоследствии процессируются (Cresswell, 1994). Комплексы из пептида и молекул МНС класса I распознаются CD8-положительными цитотоксическими Т-лимфоцитами, несущими подходящий ТКР (Т-клеточный рецептор), а комплексы из пептида и молекул МНС класса II распознаются CD4-положительными хелперными Т-клетками, несущими подходящий ТКР. Хорошо известно, что ТКР, пептид и МНС часто встречаются в стехиометрическом соотношении 1:1:1.

CD4-положительные хелперные Т-клетки играют важную роль в индуцировании и поддержании эффективных ответов CD8-положительных цитотоксических Т-клеток (Wang and Livingstone, 2003; Sun and Bevan, 2003; Shedlock and Shen, 2003). Для этой цели идентификация CD4-положительных Т-клеточных эпитопов, образованных из опухолеассоциированных антигенов (ТАА), может быть чрезвычайно важна для разработки фармацевтических препаратов для инициации противоопухолевых иммунных ответов (Kobayashi et al., 2002; Qin et al., 2003; Gnjatic et al., 2003).

При отсутствии воспаления экспрессия молекул МНС II класса преимущественно рестриктирована по клеткам иммунной системы, в особенности профессиональным антигенпрезентирующим клеткам (АПК), например моноцитам, образованным из моноцитов клеткам, макрофагам, дендритным клеткам. Неожиданно было обнаружено, что опухолевые клетки раковых пациентов экспрессируют молекулы МНС класса II (Dengjel et al., 2006).

На моделях млекопитающих животных, например мышах, было показано, что даже при отсутствии эффекторных клеток (т.е. CD8-положительных Т-лимфоцитов), CD4-положительных Т-клеток достаточно для ингибирующего проявления опухолей посредством ингибирования ангиогенеза при секреции интерферон-гамма (IFN γ) (Qin and Blankenstein, 2000). К тому же было показано, что CD4-положительные Т-клетки, распознающие пептиды из опухолеассоциированных антигенов, презентированные молекулами HLA класса II, могут препятствовать опухолевой прогрессии посредством индукции ответов антител (Ab) (Kennedy et al., 2003). В отличие от опухолеассоциированных пептидов, связывающихся с молекулами HLA класса I, до сих пор было описано лишь небольшое число опухолеассоциированных лигандов класса II (www.cancerimmunity.org, www.syfpeithi.de).

Так как конститутивная экспрессия молекул HLA класса II обычно ограничена клетками иммунной системы (Mach et al., 1996), то возможность изоляции пептидов класса II напрямую из первичных опухолей считалась невозможной. Тем не менее, Dengjel с соавторами недавно удалось идентифицировать ряд эпитопов МНС класса II напрямую из опухолей (WO 2007/028574, EP 1760088 B1; (Dengjel et al., 2006).

Для того чтобы пептид инициировал (вызывал) клеточный иммунный ответ, он должен связываться с молекулой МНС. Этот процесс зависит от аллеля молекулы МНС и специфических полиморфизмов аминокислотной последовательности пептида.

Пептиды, связывающиеся с МНС класса I, имеют обычно 8-10 аминокислотных остатков в длину и обычно содержат два консервативных остатка ("якори") в их последовательности, которые взаимодействуют с соответствующей связывающей бороздкой молекулы МНС. Таким способом каждый аллель МНС имеет "соединительный элемент", определяющий, какие пептиды могут специфически связываться со связывающей бороздкой (Rammensee et al., 1997).

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

Антигены, которые распознаются опухолевыми специфическими цитотоксическими Т-лимфоцитами, то есть их эпитопами, могут быть молекулами, образованными из любого класса белков, таких как ферменты, рецепторы, факторы транскрипции и т.д., которые экспрессированы и по сравнению с неизменными клетками того же происхождения находятся в повышенном количестве в клетках соответствующей опухоли.

Актуальная классификация опухолеассоциированных антигенов включает следующие основные группы (Novellino et al., 2005):

1. Раковые антигены семенника: первые в истории идентифицированные ТАА, которые могут распознаваться Т-клетками (van der Bruggen et al., 1991), принадлежат к этому классу, называвшемуся первоначально "антиген ракового семенника" (СТ), так как его члены экспрессируются в отличных по гистологической структуре опухолях человека, а среди нормальных тканей - только в сперматоцитах/сперматогониях семенника и, изредка, в плаценте. Так как клетки семенника не экспрессируют молекулы HLA I и II класса, то эти антигены не могут быть распознаны Т-клетками в нормальных тканях и поэтому, могут рассматриваться как иммунологически опухолеспецифические. Хорошо известными примерами антигенов СТ являются члены семейства MAGE или NY-ESO-1.

2. Дифференциационные антигены: данные ТАА встречаются в опухолевых и нормальных тканях,

из которых образуется опухоль; большинство из них имеется в меланомах и нормальных меланоцитах. Многие из этих линиеспецифических белков меланоцитов участвуют в биосинтезе меланина и поэтому не являются опухолеспецифическими, однако, несмотря на это, они широко применяются в противораковой терапии. Примеры включают, но не ограничиваются, тирозиназой и Melan-A/MART-1 для меланомы или PSA для рака простаты.

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

4. Опухолеспецифические антигены: данные уникальные ТАА образуются из мутаций нормальных генов (таких как β -катенин, CDK4 и т.д.). Некоторые из этих молекулярных изменений ассоциированы с неопластической трансформацией и/или прогрессией. Опухолеспецифические антигены в основном способны индуцировать сильные иммунные ответы, не заключая в себе риска аутоиммунных реакций по отношению к нормальным тканям. С другой стороны, данные ТАА в большинстве случаев релевантны только для определенной опухоли, на которой они были идентифицированы, и обычно не являются общими для многих отдельных опухолей.

5. ТАА, образующиеся из абнормальных посттрансляционных модификаций: такие ТАА могут образоваться из белков, которые не являются ни специфическими, ни гиперэкспрессированными в опухолях, однако, несмотря на это, становятся опухолеассоциированными в ходе посттрансляционных процессов, происходящих первоначально в опухолях. Примеры для этого класса берут свое начало в измененных паттернах гликозилирования, приводящих к новым эпитопам в опухолях, как в случае MUC1, или таких процессах как белковый сплайсинг во время деградации, который может или не может быть опухолеспецифическим (Hanada et al., 2004; Vigneron et al., 2004).

6. Онковирусные белки: данные ТАА являются вирусными белками и могут играть ведущую роль в онкогенном процессе, и, так как они являются чужеродными (не человеческого происхождения), они могут провоцировать Т-клеточный ответ. Примерами таких белков являются вирусные белки человеческой папилломы типа 16, E6 и E7, которые экспрессированы в карциноме шейки матки.

Для того чтобы белки были узнаны цитотоксическими Т-лимфоцитами в качестве опухолеспецифического или -ассоциированного антигена, в целях применения в терапии должны выполняться особые предварительные требования. Антиген должен экспрессироваться преимущественно опухолевыми клетками, а не здоровыми тканями или в сравнительно малом объеме. В дальнейшем желательно, чтобы соответствующий антиген не только присутствовал в каком-либо виде опухоли, но и также имел высокую концентрацию (т.е. число копий соответствующего пептида на клетку). Опухолеспецифические и опухолеассоциированные антигены часто образованы из белков, напрямую задействованных в трансформации нормальной клетки в опухолевую, в связи с функцией, например, при контроле клеточного цикла или подавлении апоптоза. Кроме того, мишени нисходящего пути белков, напрямую являющихся причиной трансформации, могут быть также представлены в повышенном количестве и, таким образом, косвенно опухолеассоциированными. Такие косвенно опухолеассоциированные антигены могут также быть мишенями вакцинационного подхода (Singh-Jasuja et al., 2004). В обоих случаях необходимо, чтобы эпитопы присутствовали в аминокислотной последовательности антигена, поскольку такой пептид ("иммуногенный пептид"), который образован из опухолеассоциированного антигена, должен вести *in vitro* или *in vivo* к Т-клеточному ответу.

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

Поэтому опухолеассоциированные антигены (ТАА) являются отправным пунктом для разработки противораковой вакцины. Методы идентификации и характеристики ТАА основаны на использовании ЦТЛ, которые могут быть изолированы у пациентов или здоровых субъектов, или же они основаны на генерировании дифференциальных транскрипционных профилей или дифференциальных паттернов пептидной экспрессии между опухолевыми и нормальными тканями (Lemmel et al., 2004; Weinschenk et al., 2002).

Однако идентификация генов, гиперэкспрессированных в опухолевых тканях или человеческих опухолевых клеточных линиях или же селективно экспрессированных в таких тканях или клеточных линиях, не обеспечивает точной информацией относительно использования антигенов, транскрибированных с данных генов, в иммунотерапии. Причиной тому то, что только отдельная субпопуляция эпитопов этих антигенов подходит для такого применения, так как Т-клетка с соответствующим ТКР должна быть в наличии, и необходимо, чтобы отсутствовала или была минимальной иммунологическая толерантность к этому конкретному эпитопу. Поэтому важно выбрать лишь те пептиды из гиперэкспрессированных или

селективно экспрессированных белков, которые презентуются в соединении с молекулами МНС, против которых может быть обнаружена функциональная Т-клетка. Такая функциональная Т-клетка определяется как Т-клетка, которая при стимуляции специфическим антигеном может быть распространена клонально и способна к выполнению эффекторных функций ("эффекторная Т-клетка"). В типичные функции Т-клеток входят секреция интерферон-гамма, перфорина и гранзимов.

Т-хелперные клетки играют важную роль в управлении эффекторной функцией ЦТЛ в противоопухолевом иммунитете. Эпитопы Т-хелперных клеток, инициирующие ответы Т-хелперных клеток типа Т_{H1}, поддерживают эффекторные функции CD8-положительных киллерных Т-клеток, которые включают цитотоксические функции, направленные против опухолевых клеток, проявляющих опухолеассоциированные пептиды/МНС-комплексы на их клеточной поверхности. Таким образом, опухолеассоциированные пептидные эпитопы Т-хелперных клеток, одни или в комбинации с другими опухолеассоциированными пептидами, могут служить в качестве активных фармацевтических ингредиентов вакцинных композиций, которые стимулируют противоопухолевые иммунные ответы.

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

Поэтому целью настоящего изобретения является обеспечение новых аминокислотных последовательностей для пептидов, которые способны связываться с комплексами МНС любого класса.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1a и 1b представлены масс-спектры ESI-жидкостной хроматографии, идентифицирующие опухолеассоциированные пептиды (TUMAPs) PTP-001 из пробы глиобластомы GB1006 и PTP-002 из пробы глиобластомы GB6003, которые презентуются как рестриктированные по МНС класса I.

На фиг. 2 показан профиль экспрессии мРНК гена PTPRZ1, кодирующего пептиды, ассоциированные с глиобластомой, представленные в табл. 1. Экспрессия этого гена отсутствует или находится на низком уровне в нормальных тканях, в то время как она сильно увеличена в пробах глиобластомы (GB1006T по GB1011T; NCH359T и NCH361T).

На фиг. 3 представлен репрезентативный пример для PTP-002-специфических CD8+ Т-клеток одного здорового донора с HLA-A*0201 после стимуляции *in vitro* PTP-002, как было определено проточным цитометрическим анализом. CD8+ Т-клетки были изолированы из человеческих МПК здорового донора и примированы *in vitro* с использованием молекулярно дефинированных "искусственных антигенпрезентирующих клеток" (аАПК), нагруженных костимулирующими молекулами и A*0201/PTP-002 (левая диаграмма) или нерелевантным пептидом A*0201 (правая диаграмма) (Walter et al., 2003). После трех циклов стимуляции детекция пептид-реактивных клеток производилась окрашиванием PTP-002- и нерелевантными пептидтетрамерами. Клетки высаживали в популяцию лимфоцитов CD8+, и процентные доли показывают частотность тетрамерположительных клеток внутри этой популяции.

На фиг. 4 представлены аффинности пептидов по изобретению к HLA-A*0201. Константы диссоциации (K_D) пептидов HLA класса I и пептида вирусного маркера HBV-001 были измерены основанным на методике ELISA анализом (см. пример 4).

Детальное описание изобретения

Настоящее изобретение раскрывает пептиды длиной 9-30 аминокислотных остатков, включающие последовательность SEQ ID № 5, которые способны связываться с молекулой главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) класса I, индуцировать цитотоксические CD8 Т-лимфоциты и стимулировать антиопухолевые иммунные ответы.

Данным изобретением обеспечиваются пептиды, полезные для лечения глиобластомы. Как непосредственно показал масс-спектрометрический анализ, эти пептиды естественно презентировались молекулами HLA на пробах первичной глиобластомы человека (см. пример 1 и фиг. 1). Исходный ген, из которого образованы десять этих пептидов - PTPRZ1 - был представлен в гиперэкспрессированном состоянии в глиобластоме в сравнении с нормальными тканями (см. пример 2 и фиг. 2), демонстрируя высокую степень ассоциации данных пептидов с опухолью, т.е. эти пептиды в большом количестве презентуются на опухолевой ткани, но не на нормальных тканях. Исходный ген, из которого образован одиннадцатый пептид - CH13L2 - был первоначально идентифицирован из хондроцитов. Связанные с HLA пептиды могут распознаваться иммунной системой, специально Т-лимфоцитами/Т-клетками. Т-клетки могут разрушать клетки, презентующие распознанный комплекс HLA/пептид; к примеру, опухолевые клетки глиобластомы, презентующие образованные из PTPRZ1- или CH13L2 пептиды. Как было показано, некоторые пептиды настоящего изобретения в состоянии стимулировать Т-клеточные ответы (см. пример 3 и фиг. 3). Таким образом, пептиды полезны для генерирования иммунного ответа у пациента, который может уничтожать опухолевые клетки. Иммунный ответ у пациента может быть индуцирован при непосредственном введении описанных пептидов или подходящих веществ-предшественников (к примеру, удлиненных пептидов, белков или нуклеиновых кислот, кодирующих эти пептиды) пациенту, в идеальном случае в комбинации с веществом, усиливающим иммуногенность (т.е. адьювантом). От иммун-

ного ответа, вызванного такой терапевтической вакцинацией, может ожидаться, что он будет высокоспецифическим против опухолевых клеток, так как целевые пептиды настоящего изобретения не презентуются на нормальных тканях, предотвращая тем самым риск нежелательных аутоиммунных реакций против нормальных клеток у пациента.

Кроме того, пептиды настоящего изобретения полезны не только для лечения рака, но и также в качестве диагностических средств. Так как пептиды были получены из глиобластомы, и так как было определено, что данные пептиды не присутствуют в нормальных тканях, то эти пептиды могут быть использованы для постановки диагноза о наличии рака.

Присутствие заявленных TUMAPs на тканевых биоптатах может помочь патологу в постановке диагноза рака. Детекция конкретных TUMAPs с помощью антител, масс-спектрометрии или других методов, известных из уровня техники, могут дать знать патологу, что ткань поражена злокачественным, или воспалительным, или же заболеванием общего порядка. Присутствие групп пептидов TUMAP может позволить классифицировать или выделить подклассы пораженных тканей.

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

TUMAP могут использоваться в анализе ответов лимфоцитов против этих пептидов, таких как Т-клеточные ответы или ответы антител против TUMAP или TUMAP, в комплексе с молекулами МНС. Данные иммунные ответы лимфоцитов могут использоваться в качестве прогностических маркеров для принятия решения о дальнейших этапах терапии. Данные иммунные ответы могут также использоваться в качестве суррогатных маркеров в иммунотерапевтических подходах, направленных на индуцирование ответов лимфоцитов с помощью различных средств, как, например, вакцинации белком, нуклеиновыми кислотами, аутологичными материалами, адоптивного переноса лимфоцитов. При генной терапии ответы лимфоцитов на пептиды TUMAP могут быть рассмотрены в рамках оценки побочных эффектов. Мониторинг ответов лимфоцитов может также быть ценным инструментом для последующих обследований в случае трансплантации, к примеру, для детекции реакций "хозяин против трансплантата" и "трансплантат против хозяина".

TUMAP могут использоваться для генерации и разработки специфических антител к комплексам МНС/TUMAP. Они могут быть использованы в терапии, нацеливающей токсины или радиоактивные вещества на пораженную ткань. Другим видом использования данных антител может быть "нацеливание" радионуклидов на пораженную ткань в целях визуализации, такой как PET (позитронно-эмиссионная томография). Это может помочь в обнаружении небольших метастазов или в определении размера и точного расположения пораженных тканей.

Кроме того, пептиды могут быть использованы для верификации диагноза патолога, поставленного на основании биоптата.

В табл. 1 показаны пептиды в соответствии с настоящим изобретением, соответствующие им номера последовательностей SEQ ID №, аллели HLA, с которыми связываются соответствующие пептиды и исходные белки, из которых могут быть образованы данные пептиды.

Таблица 1

Пептиды настоящего изобретения

SEQ ID №	Код пептида	Последовательность	Аллели HLA	Исходный белок (белки)
1	PTP-001	ALTTLMHQL	A*0205	PTPRZ1
2	PTP-002	FLYKVLISL	A*02	PTPRZ1
3	PTP-003	AIIDGVESV	A*02	PTPRZ1
4	PTP-004	FLLPDTDGL	A*02	PTPRZ1
5	PTP-005	KVFAGIPTV	A*02	PTPRZ1
6	PTP-006	QQSDYSAAL	A*02#	PTPRZ1
7	PTP-007	TQDDYVLEV	A*02#	PTPRZ1, PTPRG
8	PTP-008	QHEGTVNIF	B*38 He	PTPRZ1 PTPRZ1
9	PTP-009	SVFGDDNKALSK	определено	
10	PTP-010	EIGWSYTGALNQKN	HLA-DR	PTPRZ1
11	CHI-001	SLWAGVVVL	A*02	CHI3L2

- вероятно, подвид A*205.

Неожиданным образом, было обнаружено, что SEQ ID № 2 презентуется в первичной аденокарциноме (форма рака легких) и может поэтому использоваться для лечения названной формы

рака в соответствии с описанным выше.

Белковая тирозинфосфатаза рецепторного типа Zeta1 (PTPRZ1, PTP-ξ).

PTPRZ1 является членом семейства белковых тирозинфосфатаз рецепторного типа и кодирует проходящий через мембрану только один раз мембранный белок I типа с двумя цитоплазматическими тирозинбелковыми фосфатазными доменами, одним альфа-углеродным ангидразным доменом и фибронектиновым доменом III типа (Wu et al., 2006), при раке груди (Perez-Pinera et al., 2007), при повторной миеленизации олигодендроцитов при поражении множественным склерозом (Harroch et al., 2002) и в эмбриональных клетках почек человека в условиях гипоксии (Wang et al., 2005).

Как белок, так и транскрипт гиперэкспрессированы в клетках глиобластомы, способствуя их гапто-тактической миграции (Lu et al., 2005). Кроме того, PTRPZ1 часто амплифицирован на уровне геномной ДНК в глиобластоме (Mulholland et al., 2006).

Kaplan и соавторы клонировали 3 гена человеческих рецепторов PTP, включая PTP-γ (Kaplan et al., 1990). Было показано, что один аллель PTRPG был потерян в 3 из 5 клеточных линий почечной карциномы и в 5 из 10 опухолевых проб карциномы легких, которые были исследованы. PTP-γ мРНК был экспрессирован в клеточных линиях почек и легких, но не в нескольких исследованных клеточных линиях кровеносной системы. Таким образом, ген PTP-γ проявил характеристики, позволяющие предположить, что он может быть геном-супрессором опухоли в карциноме почек и легкого. Gebbink и соавторы изолировали мышинный кДНК 5,7 kb, кодирующий "новый" член семейства белковых тирозинфосфатаз рецепторного типа, названный RPTPμ (Gebbink et al., 1991). кДНК прогнозировала белок из 1.432 аминокислот (не включая сигнальный пептид) с рассчитанной молекулярной массой в 161,636 Да. Кроме того, они клонировали человеческий гомолог, который проявил аминокислотную гомологию в 98,7% с мышинным белком. Спрогнозированный мышинный белок состоял из внеклеточного региона с 722 аминокислотами, содержащего 13 потенциальных сайтов N-гликозилирования, одиночного трансмембранного домена, и внутриклеточной части с 688 аминокислотами, содержащей два tandemных повтора, гомологичных с каталитическими доменами других тирозинфосфатаз. Блот-анализ РНК показал единственный транскрипт, который был наиболее широко распространен в легких, но присутствует также в намного меньшем количестве в головном мозге и сердце. Человеческий ген PTPμ был соотнесен с 18pter-qll с помощью Саузерн блот-анализа клонов гибридов соматических клеток человека/грызунов.

PTP-ε кДНК была изолирована Krueger с соавторами (Krueger et al., 1990). Белок из 700 аминокислот имеет короткий внеклеточный домен и два внутриклеточных домена белковой тирозинфосфатазы с tandemным повтором. Высокие уровни транскрипции PTP-ε были зафиксированы в головном мозге и семенниках мышей. Обе изоформы PTP-ε - трансмембранная изоформа рецепторного типа и более короткая, цитоплазматическая - видимо, образованы из одного гена посредством использования альтернативного промотора и 5-прайм экзонов.

Varnea и соавторы (Varnea et al., 1993) клонировали кДНК для генов PTP-γ человека и мыши (называемые PTP-γ в этой группе) из библиотек кДНК головного мозга и анализировали спрогнозированные ими полипептидные последовательности. Человеческие (1.445 аминокислот) и мышинные (1.442 аминокислот) последовательности идентичны на 95% на аминокислотном уровне и прогнозируют предполагаемый внеклеточный домен, отдельный трансмембранный домен и цитоплазматический участок с 2 tandemными каталитическими доменами тирозинфосфатазы. Внеклеточный домен содержит фрагмент из 266 аминокислот, которые сильно сходны с цинксодержащей ферментной карбоангидразой (MIM 114800), позволяя предположить, что PTP-γ и PTP-ξ (PTPRZ1) представляют подсемейство 25 рецепторных тирозинфосфатаз. Ген для PTP-γ имеет 30 экзонов и размер в приблизительно 780 kb. Он намного крупнее других рецепторных генов PTP, среди которых ген CD45 (MIM 151460) размером в 100 kb и других, еще более мелких.

Другая тирозинфосфатаза рецепторного типа, белковая тирозинфосфатаза зета (PTPRZ1) [также известная как PTP-ξ, HPTP-ZETA, HPTPZ, RPTP-BETA(β) или RPTPB], была изолирована как последовательность кДНК двумя группами в начале девяностых. Levy и соавторы (Levy et al., 1993) изолировали клоны кДНК из экспрессионной библиотеки мРНК ствола детского головного мозга человека и получили полную аминокислотную последовательность крупной белковой тирозинфосфатазы рецепторного типа, содержащей 2.307 аминокислот.

Levy обнаружил, что белок, называемый PTPβ (PTPRZ1), является трансмембранным белком с двумя цитоплазматическими доменами PTP-азы и внеклеточным доменом в 1.616 аминокислот. Как в PTP-γ (MIM 176886), 266 N-терминальных остатков внеклеточного домена имеют высокую степень сходности с углеродными ангидразами (см. MIM 114880). Человеческий ген, кодирующий PTPRZ1, был картирован на хромосому 7q31.3-q32 при хромосомной гибридизации *in situ* (Agiyama et al., 1995). Анализ методом нозерн-блоттинга показал, что PTP-зета экспрессирована только в центральной нервной системе человека. При гибридизации *in situ* (Levy et al., 1993) локализовали экспрессию на различных участках головного мозга взрослого человека, включая слой клеток Пуркинье мозжечка, зубчатых извилин и субependимальный слой переднего рога желудочка. Levy заявил, что это была первая тирозинфосфатаза млекопитающих, экспрессия которой рестриктирована по нервной системе. Более того, высокие уровни экс-

прессии в эмбриональном головном мозге мышей позволяют предположить важную роль в развитии ЦНС.

Таким образом, рецепторное семейство РТР белков было охарактеризовано как справедливо отличающееся от других семейство мембраносвязанных рецепторов и не связанных с мембраной изоформ, которые имеют общую архитектуру цитозольного домена РТР-азы. Хотя их экспрессия в фетальных и эмбриональных тканях предполагала связанную с развитием биологическую роль для белков, их полная функция в нормальной биологии и в состоянии болезни до сих пор не понята полностью.

В патенте США 6455026 РТР- ξ (PTPRZ1) идентифицирована как мишень при лечении и визуализации опухолей головного мозга. В этой заявке обеспечиваются методы и реагенты для специфического нацеливания на клетки опухоли головного мозга как в терапевтических, так и визуализационных целях. Обеспечиваются основанные на аффинности РТР- ξ соединения и композиции, полезные для лечения опухоли головного мозга у пациента, где композиции и соединения подразделяются в основном на две группы: связывающиеся с РТР- ξ конъюгатные соединения, которые включают цитотоксическое составляющее, ингибирующее рост опухолевых клеток; и связывающиеся с РТР- ξ композиции, в которых связывающее составляющее РТР- ξ изменяет нормальную функцию РТР- ξ в опухолевой клетке, тем самым, ингибируя рост клетки.

В первой группе обеспечиваются связывающиеся с РТР- ξ терапевтические конъюгатные соединения. Данные соединения имеют общую формулу $\alpha(P_z)C$, где $\alpha(P_z)$ являются одним или более составляющими, которые специфически связываются с человеческой белковой тирозинфосфатазой- ξ , и C является одним или более цитотоксическим составляющим. В предпочтительных воплощениях (что было раскрыто для всех групп) $\alpha(P_z)$ раскрывается как антитело или фрагмент антитела. Во второй группе обеспечиваются связывающиеся с РТР- ξ терапевтические соединения, которые изменяют нормальную функцию РТР- ξ в клетках опухоли головного мозга и ингибируют рост опухолевых клеток головного мозга. Данные связывающиеся с PTPRZ1 терапевтические соединения имеют общую формулу $\alpha(P_z)$, где $\alpha(P_z)$ является одним или более составляющими, которые специфически связываются с человеческой белковой тирозинфосфатазой- ξ , и где связывание $\alpha(P_z)$ изменяет функцию белковой тирозинфосфатазы- ξ .

Патент США № 7060275 В2 раскрывает сплайсинговые варианты PTPRZ1, векторы, включающие эти варианты, и антигены против различных вариантов.

Хитиназа-3-подобный белок 2 (CH3L2).

CH3L2 был первоначально идентифицирован в хондроцитах. Его часто описывали как антиген-мишень при ревматическом артрите. Релевантной взаимосвязи CH3L2 с раком установлено не было. Имелось подозрение, что хитиназа-3-подобные белки стимулируют пролиферацию человеческих клеток соединительной ткани, например фибробластов, посредством активирования внеклеточной сигнал-регулируемой киназы и опосредованных PKB (протеинкиназа) сигнальных путей (Recklies A.D., White C., Ling H.; The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 (HC-gp39) stimulates proliferation of human connective-tissue cells and activates both extracellular signal-regulated kinase- and protein kinase B-mediated signalling pathways; *Biochem J.* 2002; 365:119-126). У мышей был обнаружен сильно повышенный уровень хитиназа-3-подобных белков в моделях индуцированного хеликобактериями рака желудка (Takaishi S., Wang T.C.; Gene expression profiling in a mouse model of Helicobacter-induced gastric cancer; *Cancer Sci.* 2007 (3): 284-293).

Нигде в известном уровне техники не рассматривалось применение связывающихся с МНС пептидов, образованных из PTPRZ1 или CH3L2, в качестве активных фармацевтических ингредиентов для лечения опухолей головного мозга.

В первом своем аспекте изобретение обеспечивает, таким образом, пептид, включающий последовательность, которая выбирается из группы SEQ ID № 1 по SEQ ID № 11 или их вариант, который на 80% гомологичен SEQ ID № 1 по SEQ ID № 11, или их вариант, который будет индуцировать Т-клеточную перекрестную реакцию с указанным пептидом.

Пептиды изобретения обладают способностью связываться с молекулой главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) класса I или II.

В настоящем изобретении термин "гомологичный" относится к степени идентичности между последовательностями двух аминокислотных последовательностей, т.е. пептидных или полипептидных последовательностей. Упомянутая ранее "гомология" определяется при сравнении двух последовательностей, сопоставляемых в оптимальных условиях со сравнимыми последовательностями. Сравнимые последовательности могут иметь дополнение или делецию (например, разрыв и т.п.) в оптимальном противопоставлении двух последовательностей. Такая гомология последовательности может быть подсчитана с помощью создания противопоставления, например, по алгоритму ClustalW (*Nucleic Acid Res.*, 1994, 22(22): 4673-4680). Также может быть использовано широко распространенное программное обеспечение для анализа последовательностей, в частности Vector NTI, GENETYX или аналитические инструменты, предоставляемые общественными банками данных, такие как, например, представленные на сайте <http://dragon.bio.purdue.edu/bioinfolinks/>.

Специалист данной области будет в состоянии оценить, будут ли Т-клетки, индуцированные вари-

антом специфического пептида, способны к перекрестной реакции с самим пептидом (Fong et al., 2001); (Zaremba et al., 1997; Colombetti et al., 2006; Appay et al., 2006).

"Вариантом" данной аминокислотной последовательности изобретатели обозначают, что боковые цепи, например, одного или двух аминокислотных остатков изменены (например, при их замещении боковой цепью другого встречающегося в природе аминокислотного остатка или какой-либо другой боковой цепью), так что пептид по-прежнему способен связываться с молекулой HLA, по существу, таким же путем, как и пептид, состоящий из данной аминокислотной последовательности с SEQ ID № 1 по 11. Например, пептид может быть модифицирован таким образом, что он, по крайней мере, сохранит, если не улучшит, способность взаимодействовать и связываться со связывающей бороздкой подходящей молекулы MHC, такой как HLA-A*02 или -DR, и, таким образом, он, по крайней мере, сохранит, если не улучшит, способность связываться с ТКР активированных ЦТЛ. Данные ЦТЛ могут впоследствии вступать в перекрестную реакцию с клетками и уничтожать клетки, которые экспрессируют полипептид, который содержит естественную аминокислотную последовательность родственного пептида, как определено в аспектах этого изобретения. По информации из научной литературы (Rammensee et al., 1997) и банков данных (Rammensee et al., 1999) конкретные позиции связывающихся с HLA пептидов являются типичными якорными остатками, формирующими центральную последовательность, подходящую к соединительному элементу рецептора HLA, который определяется полярными, электрофизическими, гидрофобными и пространственными свойствами полипептидных цепей, образующих связывающую бороздку. Так специалист данной области будет в состоянии модифицировать аминокислотные последовательности, предложенные в SEQ ID № 1 по 11, сохраняя известные якорные остатки, и будет в состоянии определить, сохранят ли такие варианты способность связываться с молекулами MHC класса I или II. Варианты настоящего изобретения сохраняют способность связываться с ТКР активированных ЦТЛ, которые могут впоследствии вступать в перекрестную реакцию с и уничтожать клетки, экспрессирующие полипептид, который содержит естественную аминокислотную последовательность родственного пептида, как определено в аспектах этого изобретения.

Те аминокислотные остатки, которые не обязательно вносят вклад во взаимодействие с Т-клеточным рецептором, могут быть модифицированы при замещении другой аминокислотой, чье включение, по существу, не влияет на реактивность Т-клетки и не устраняет связь с релевантным MHC. Таким образом, помимо данного условия, пептид по изобретению может быть любым пептидом (в обозначение которого изобретатели включают олигопептиды или полипептиды), который включает аминокислотные последовательности или их участок или их вариант, как дано.

Таблица 2
Варианты и участок пептидов в соответствии с SEQ ID № 1 по 10

PTP-001	Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Код пептида		A	L	T	T	L	M	H	Q	L
Варианты		V		P	E	V	I	H	Y	
		Y		F	D	L	V	V		
				I	K	I	L			
				M	N		A			
					P					

034800

		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9
RTP-002	Код пептида		F	L	Y	K	V	I	L	S	L
	Варианты			M							L
						E					K
			I		A	G	I	I	A	E	
			L		Y	P	K	L	Y	S	
			F		F	D	Y	T	H		
			K		P	T	N				
			M		M		G				
			Y		S		F				
			V		R		V				
						K	H				
RTP-003		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Код пептида		A	I	I	D	G	V	E	S	V
	Варианты			M							L
				L							L
						E					K
			I		A	G	I	I	A	E	
			L		Y	P	K	L	Y		
			F		F	T	Y	T	H		
			K		P		N				
			M		M		F				
			Y		S		V				
			V		R						
RTP-004		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Код пептида		F	L	L	P	D	T	D	G	L
	Варианты			M							L
						E					K
			I		A	G	I	I	A	E	
			L		Y	D	K	L	Y	S	
			K		F	T	Y		H		
			M		P		N				
			Y		M		G				
			V		S		F				
					R		V				
						K	H				
RTP-005		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Код пептида		K	V	F	A	G	I	P	T	V
	Варианты			M							L
				L							L
						E					K
			I		A	G	I		A	E	
			L		Y	P	K	L	Y		
			F		P	T	Y	T	H		
			M		M		N				
			Y		S		F				
							V				
RTP-006		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Код пептида		Q	Q	S	D	Y	S	A	A	L
	Варианты		V		P	E	V	I	H	Y	
			Y		F	K	L	V	V		
					I	N	I	L			
					M	P		A			
RTP-007		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Код пептида		T	Q	D	D	Y	V	L	E	V
	Варианты		V		P	E	V	I	H	Y	L
			Y		F	K	L	V	V		
					I	N	I	L			
					M	P		A			
RTP-008		Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Код пептида		Q	H	E	G	T	V	N	I	F
	Варианты				D						
			I			E	M	V	Y	K	
						P	V	I	V	Y	
						L	A	T	N	N	
						E	R	K		R	
						G	N				
						L	H				
						K					
						S					

В дальнейшем известно, что пептиды, презентированные МНС класса II, образованы "коровой последовательностью", имеющей аминокислотную последовательность, подходящую к конкретному HLA-аллель-специфическому фрагменту и, факультативно, N- и/или C-терминальные удлиняющие сегменты, которые не препятствуют функции коровой последовательности (т.е. считаются нерелевантными для взаимодействия пептида и всех или подклассов клонов Т-клетки, распознающих естественную копию). N- и/или C-терминальные удлиняющие сегменты могут иметь длину, например, от 1 до 10 аминокислот, соответственно. Эти пептиды могут быть использованы как непосредственно для загрузки на молекулы МНС класса II, так и последовательность может быть клонирована на векторы в соответствии с описанным ниже. Так как эти пептиды образуют конечный продукт процессинга более длинных пептидов внутри клетки, то более длинные пептиды могут использоваться в равной степени. Пептиды по изобретению могут быть любого размера, но в основном они могут иметь молекулярный вес меньше чем 100000, предпочтительно меньше чем 50000, более предпочтительно меньше чем 10000 и типично около 5000. В отношении числа аминокислотных остатков пептиды по изобретению могут иметь менее чем 1000 остатков, предпочтительно менее чем 500 остатков, более предпочтительно менее чем 100 остатков и наиболее предпочтительно между 30 и 8 остатками. Соответственно настоящее изобретение обеспечивает также пептиды и их варианты, в которых указанный пептид или вариант имеет общую длину между 8 и 100, предпочтительно между 8 и 30 и наиболее предпочтительно между 8 и 16, а именно 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 аминокислот.

В соответствии с этим встречающиеся в природе или искусственные варианты, которые индуцируют Т-клеточную перекрестную реакцию с пептидом по изобретению, часто являются вариантами по длине.

Если пептид, который длиннее, чем около 12 аминокислотных остатков, непосредственно используется для связывания с молекулой МНС II класса, предпочтительно чтобы остатки, которые примыкают к центральному HLA-связывающему региону, по существу, не влияли на способность пептида специфически связываться со связывающей бороздкой молекулы МНС II класса или презентировать пептид Т-(хелперной) клетке. Тем не менее, как уже было указано выше, следует понимать, что могут быть использованы более крупные пептиды, например, если они закодированы полинуклеотидом, потому что такие крупные пептиды могут быть разделены на фрагменты подходящими антигенпрезентирующими клетками.

Также возможно, чтобы эпитопы МНС I класса, хотя они обычно имеют длину между 8-10 аминокислотами, генерировались при процессинге пептидов из более длинных пептидов или белков, включающих истинный эпитоп. Предпочтительно чтобы остатки, которые примыкают к истинному эпитопу, по существу, не влияли на протеолитическое расщепление, необходимое для выявления истинного эпитопа во время процессинга.

Соответственно настоящее изобретение обеспечивает также пептиды и варианты эпитопов МНС класса I, в которых указанный пептид или вариант имеет общую длину между 8 и 100, предпочтительно между 8 и 30 и наиболее предпочтительно между 8 и 16, а именно 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 аминокислот.

Разумеется, пептид или вариант в соответствии с настоящим изобретением будет обладать способностью связываться с молекулой главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) I или II класса. Связывание пептида или варианта с комплексом МНС может быть проверено методами, известными из уровня техники, например, теми, что описываются в литературе для различных аллелей МНС II класса (к примеру, Vogt et al., 1994; Malcherek et al., 1994; Manici et al., 1999; Hammer et al., 1995; Tompkins et al., 1993; Boyton et al., 1998).

В особенно предпочтительном воплощении изобретения пептид состоит или преимущественно состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID № 1 по SEQ ID № 11.

"Состоящий преимущественно из" подразумевает, что пептид в соответствии с настоящим изобретением, помимо последовательности в соответствии с любой из SEQ ID № 1 по SEQ ID № 11 или одним из их вариантов, содержит дополнительные находящиеся на N- и/или C-конце фрагменты аминокислот, которые не являются обязательно формирующими часть пептида, которая функционирует как эпитоп для эпитопа молекул МНС.

Тем не менее, эти фрагменты могут быть важны в целях обеспечения эффективного введения пептида в соответствии с настоящим изобретением в клетки. В одном воплощении настоящего изобретения пептид является белком слияния, который включает, например, 80 N-терминальных аминокислот HLA-DR антигенассоциированной инвариантной цепи (p33, в дальнейшем "Ii"), как взятый из NCBI, инвентарный номер - GenBank Accession-number X00497 (Strubin, M. et al. 1984).

Примеры для дальнейших предпочтительных пептидов таковы, что пептид выбирается из пептида, имеющего специфический подвид HLA, и способен стимулировать клетки CD8, и где указанный пептид включает специфический якорный аминокислотный фрагмент, как приведено в последующей табл. 2а.

Таблица 2а

Подвиды HLA и якорные фрагменты предпочтительных пептидов

Пептид	Подвид HLA	Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	A*0205	Код пептида	A	L	T	T	L	M	H	Q	L
		Якорный фрагмент	x	L	x	x	x	x	x	x	L
2	A*02	Код пептида	F	L	Y	K	V	I	L	S	L
		Якорный фрагмент	x	L	x	x	x	x	x	x	L
3	A*02	Код пептида	A	I	I	D	G	V	E	S	V
		Якорный фрагмент	x	I	x	x	x	x	x	x	V
4	A*02	Код пептида	F	L	L	P	D	T	D	G	L
		Якорный фрагмент	x	L	x	x	x	x	x	x	L
5	A*02	Код пептида	K	V	F	A	G	I	P	T	V
		Якорный фрагмент	x	V	x	x	x	x	x	x	V
6	A*02 (probably subtype A*205)	Код пептида	Q	Q	S	D	Y	S	A	A	L
		Якорный фрагмент	x	Q	x	x	x	x	x	x	L
7	A*02 (probably subtype A*205)	Код пептида	T	Q	D	D	Y	V	L	E	V
		Якорный фрагмент	x	Q	x	x	x	x	x	x	V
8	B*38	Код пептида	Q	H	E	G	T	V	N	I	F
		Якорный фрагмент	x	H	E	x	x	x	x	x	F
X	A*02	Общий якорный фрагмент для пептидов	x	L/V	x	x	x	x	x	x	L/V

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

В пептидах с обратной связью аминокислотные остатки присоединены не пептидными связями (-CO-NH-), но пептидная связь является обратной. Такие ретрообратные пептидомиметики могут быть получены методами, известными из уровня техники, например, такими, как описано в работе Meziere и соавторов (1997) J. Immunol. 159-3237, включенной сюда путем ссылки. Этот принцип охватывает получение псевдопептидов, содержащих изменения, которые охватывают остов, но не ориентацию боковых цепей. Meziere и соавторы (1997) показывают, что эти псевдопептиды пригодны для связывания с MHC и ответов Т-хелперных клеток. Ретрообратные пептиды, которые содержат связи NH-CO вместо пептидных связей CO-NH, намного более устойчивы к протеолизу.

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

Пептиды, включающие последовательности, описанные выше, могут быть синтезированы с дополнительными химическими группами, находящимися на их аминном и/или карбоксильном концах, так что, например, улучшается стабильность, биологическая доступность и/или аффинность пептидов. Например, гидрофобные группы, такие как карбобензоксильные, данзильные или трет-бутилоксикарбонильные группы, могут быть добавлены к аминным окончаниям пептидов. Подобным образом, ацетильная группа или 9-фторенилметоксикарбонильная группа может быть введена в аминные окончания пептидов. Кроме того, гидрофобная группа, трет-бутилоксикарбонильная или амидная группа может быть добавлена к карбоксильным окончаниям пептидов.

Далее все пептиды по изобретению могут быть синтезированы, так что будет изменена их пространственная конфигурация. Например, D-изомер одного или более аминокислотных остатков пептида может быть использован скорее, чем обычный L-изомер. Более того, по крайней мере один из аминокислотных остатков пептидов по изобретению может быть замещен одним из хорошо известных не встречающихся в природе аминокислотных остатков. Изменения, такие как данные, могут служить для повышения стабильности, биологической доступности и/или связывающих свойств пептидов по изобретению.

Подобным образом, пептид или вариант по изобретению может быть модифицирован химическим способом посредством реакции специфических аминокислот как до, так и после синтеза пептида. Примеры таких модификаций хорошо известны из уровня техники и обобщаются, например, в работе R. Lundblad, *Chemical Reagents for Protein Modification*, 3rd ed. CRC Press, 2005, которая включена сюда путем ссылки. Химическая модификация аминокислот включает, но не ограничивается, модификацию с помощью ацилирования, амидирования, пиридоксилрования лизина, восстановительного алкилирования, тринитробензилирования аминных групп 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислотой (TNBS), амидную модификацию карбоксильных групп и сульфгидрильную модификацию с помощью окисления надмуравьиной кислотой цистеина до цистеиновой кислоты, образование ртутных производных, образование смешанных дисульфидов с другими тиоловыми соединениями, реакцию с малеимидом, карбоксиметилирование йодоуксусной кислотой или йодацетамидом и карбамоилирование цианатом при щелочном уровне pH, хотя не ограничиваясь ими. В этой связи специалист данной области может проконсультироваться с главой 15 раздела "Current Protocols" в журнале "Protein Science", Eds. Coligan et al. (John Wiley & Sons NY 1995-2000) для получения более обширной информации о методах, связанных с химической модификацией белков.

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

Также распространена селективная редукция дисульфидных связей в белках. Дисульфидные связи могут быть образованы и окислированы во время тепловой обработки биофармацевтических средств.

K-реагент Вудворда может использоваться для модификации специфических остатков глутаминовой кислоты. N-(3-(диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимид может использоваться для формирования внутримолекулярных поперечных связей между остатком лизина и остатком глутаминовой кислоты.

Например, диэтилпирокарбонат является реагентом для модификации остатков гистидила в белках. Гистидин может также быть модифицирован при использовании 4-гидрокси-2-ноненала.

Реакция остатков лизина и других α -аминных групп полезна, например, при связывании пептидов с поверхностями или перекрестном связывании (кросс-линкинг) белков/пептидов. Лизин является сайтом присоединения поли(этилен)гликоля и основным сайтом модификации при гликировании белков.

Остатки метионина в белках могут быть модифицированы с помощью, например, йодацетамида, бромэтиламина и хлорамина T.

Тетранитрометан и N-ацетилимидазол могут быть использованы для модификации остатков тирозила. Кросс-линкинг через образование дитирозина может быть произведен с ионами перекиси водорода/меди.

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

Успешная модификация терапевтических белков и пептидов с PEG-полиэтиленгликолем часто ассоциируется с увеличением циркуляторного полураспада, в то время как кросс-линкинг белков с глутаральдегидом, полиэтиленгликоль-диакрилатом и формальдегидом используется для приготовления гидрогелей. Химическая модификация аллергенов для иммунотерапии часто достигается при карбамоилировании цианатом калия.

Пептид или вариант, в котором пептид модифицирован или включает непептидные связи, является предпочтительным воплощением изобретения. В целом, пептиды и варианты (по крайней мере, те, что содержат пептидные связи между аминокислотными остатками) могут быть синтезированы Fmoc-полиамидным способом твердофазного пептидного синтеза, как раскрыто у Lu и соавторов (1981) и в прилагающихся ссылках. Временная защита N-аминогруппы предусмотрена группой 9-флуоренилметилоксикарбонил (Fmoc). Повторное расщепление этой высокощелочлабильной защитной группы осуществляется при использовании 20% пиперидина в N,N-диметилформамиде. Функциональности боковой цепи могут быть защищены как их бутиловые эфиры (в случае серинтреонина и тирозина), бутиловые сложные эфиры (в случае глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты), бутилоксикарбонилловое производное (в случае лизина и гистидина), тритиловое производное (в случае цистеина) и производное 4-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфоната (в случае аргинина). Где глутамин или аспарагин являются C-терминальными остатками, для защиты боковой цепи амидофункциональностей используется 4,4'-диметоксибензгидрильная группа. Твердофазный носитель основан на полимере полидиметилакриламида, состоящем из трех мономеров: диметилакриламида (остов-мономер), бисакрилоилэтилендиамина (кросс-линкер) и метилового эфира акрилоилсаркозина (функционализирующий агент). Использованным агентом с расщепляемым соединением пептид-смола является кислотнотлабильное производное 4-гидроксиметилфеноксиуксусной кислоты. Все аминокислотные производные

добавляются как их преформированные симметричные ангидридные производные, за исключением аспарагина и глутамина, которые добавляются с применением метода обратного соединения, опосредованного N, N-дициклогексилкарбодиимид/1-гидроксибензотриазолом. Все реакции сочетания и снятия защитных групп отслеживались с помощью нингидрина, тринитробензолсульфоновой кислоты или технологии контроля изотинном. После завершения синтеза пептиды отщепляются от смолы-носителя сопутствующим удалением защитных групп боковой цепи при обработке 95% трифторуксусной кислотой, содержащей 50% поглотителя примесей. Обычно используемые поглотители - это этандитиол, фенол, анизол и вода, окончательный выбор зависит от составляющих аминокислот синтезированного пептида. Также возможна комбинация твердофазных и жидкофазных методов для синтеза пептидов (см., например, Bruckdorfer et al. 2004 и прилагающиеся ссылки).

Трифторуксусная кислота удаляется выпариванием в вакууме с последующим измельчением с диэтиловым эфиром для получения сырого пептида. Любые представленные поглотители удаляются простой технологией экстракции, которая при лиофилизации водной фазы позволяет получить сырой пептид без поглотителей. Реагенты для синтеза пептидов, как правило, имеются в наличии, например, в Calbiochem-Novabiochem (Великобритания) Ltd, Nottingham NG7 2QJ, Великобритания.

Очистка может быть произведена любой техникой или комбинацией таких техник как рекристаллизация, эксклюзивная хроматография, ионообменная хроматография, хроматография гидрофобного взаимодействия и (обычно) обратнофазная высокоэффективная жидкостная хроматография с использованием, к примеру, градиентного разделения ацетонитрил/вода.

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

Дальнейший аспект изобретения обеспечивает нуклеиновую кислоту (например, полинуклеотид), кодирующую пептид или вариант по изобретению. Полинуклеотид может быть, например, ДНК, кДНК, ПНК, ЦНК, РНК или их комбинациями, как одно-, так и/или двухнитевыми; натуральными или стабилизированными формами полинуклеотидов, таких как, например, полинуклеотиды с фосфоротиоатным остовом, и может или не может содержать интроны в период времени кодирования для пептида. Конечно, это только пептиды, которые содержат встречающиеся в природе аминокислотные остатки, присоединенные природными пептидными связями, которые могут кодироваться полинуклеотидом. Еще один дальнейший аспект изобретения обеспечивает вектор экспрессии, способный экспрессировать полипептид в соответствии с изобретением.

Был разработан ряд методов для связывания полинуклеотидов, в особенности ДНК, с векторами, например, с помощью дополнительных липких концов. К примеру, в сегмент ДНК могут быть добавлены дополнительные гомополимерные участки для внесения в вектор ДНК. Вектор и сегмент ДНК в таком случае соединены водородной связью между дополнительными гомополимерными концевыми участками, образуя рекомбинантные молекулы ДНК.

Синтетические сшивающие агенты, содержащие один или несколько сайтов рестрикции, обеспечивают альтернативный способ присоединения сегмента ДНК к векторам. Синтетические сшивающие агенты, содержащие ряд сайтов рестрикционной эндонуклеазы, имеются в продаже в различных источниках, включая International Biotechnologies Inc, New Haven, CN, США.

Желаемый способ модификации ДНК, кодирующей полипептид по изобретению, - это использование цепной реакции полимеразы, как раскрыто в работе (Saiki et al (1988)). Этот метод может быть использован для введения ДНК в подходящий вектор, например, при инженерии в подходящих сайтах рестрикции, или же он может быть использован для модификации ДНК другими пригодными путями, известными из уровня техники. Если используются векторы, то предпочтительными являются оспенные или аденовирусные векторы.

Затем ДНК (или в случае ретровирусных векторов РНК) может экспрессироваться в подходящего хозяина для получения полипептида, включающего пептид или вариант по изобретению. Таким образом, ДНК, кодирующая пептид или вариант по изобретению, может быть использована в соответствии с известными техниками, модифицированная соответствующим образом с учетом приведенных здесь идей, для создания вектора экспрессии, который затем используется для трансформации подходящей клетки-хозяина для экспрессии и получения полипептида по изобретению. Такие техники включают также те, что раскрыты в патентах США №: 4440859, 4530901, 4582800, 4677063, 4678751, 4704362, 4710463, 4757006, 4766075 и 4810648, которые все вводятся в описание посредством отсылки.

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

Как правило, ДНК вводится в вектор экспрессии, такой как плазмида, с правильной ориентацией и корректной рамкой считывания экспрессии. Если необходимо, то ДНК может быть сцеплена с адекват-

ными транскрипционными и трансляционными регулирующими контрольными нуклеотидными последовательностями, распознающимися желательным хозяином, хотя такой контроль обычно имеется в векторе экспрессии. Вектор вводится затем хозяину стандартными способами. Как правило, не все хозяева трансформируются вектором. Поэтому будет необходимо выбрать трансформированные клетки-хозяева. Одна из техник отбора включает введение в вектор экспрессии последовательности ДНК с любыми необходимыми элементами контроля, кодирующей выбранный признак в трансформированной клетке, такой как невосприимчивость к антибиотикам.

Альтернативно ген для такого выбираемого признака может быть на другом векторе, который используется для котрансформации желаемой клетки-хозяина.

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

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

Типичная клеточная векторная плаزمида млекопитающих для конститутивной экспрессии включает промотор CMV или SV40 с подходящим концевым участком поли А и маркером устойчивости, таким как неомицин. Одним примером является pSVL, имеющийся в наличии в Pharmacia, Piscataway, NJ, США. Примером индуцируемого вектора экспрессии млекопитающих является pMSG, имеющийся также в наличии в Pharmacia. Пригодными плазмидными векторами дрожжей являются pRS403-406 и pRS413-416, и они, как правило, имеются в наличии в Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, США. Плазмиды pRS403, pRS404, pRS405 и pRS406 являются дрожжевыми интегрирующими плазмидами (YIps) и включают дрожжевые селективируемые маркеры HIS3, TRP1, LEU2 и URA3. Плазмиды pRS413-416 являются дрожжевыми центромерными плазмидами (Ycps). Основанные на промоторе векторы CMV (например, из Sigma-Aldrich) обеспечивают кратковременную или устойчивую экспрессию, цитоплазмическую экспрессию или секрецию и N-терминальную или C-терминальную маркировку в различных комбинациях FLAG, 3xFLAG, c-тус или MAT. Данные белки слияния позволяют детекцию, очистку и анализ рекомбинантного белка. Слияния с двойной меткой обеспечивают гибкость при детекции.

Сильный промоторный регуляторный участок цитомегаловируса человека (CMV) возбуждает конститутивные уровни белковой экспрессии, достигающие 1 мг/л в клетках COS. Для менее активных клеточных линий белковые уровни типично составляют ~0,1 мг/л. Присутствие точки начала репликации SV40 будет приводить к высоким уровням репликации ДНК в терпящих репликацию SV40 клетках COS. Векторы CMV, например, могут содержать точку начала для репликации pMB1 (производное pBR322) в бактериальных клетках, ген б-лактамазы для отбора устойчивости к ампициллину у бактерий, hGH polyA и точку начала fl. Векторы, содержащие лидерную последовательность пре-про-трипсина (PPT), могут направлять секрецию белков слияния FLAG в культуральную среду для очистки с использованием антител ANTI-FLAG, смол и планшетов. Другие векторы и системы экспрессии для применения с различными клетками-хозяевами хорошо известны из уровня техники.

Настоящее изобретение относится также к клетке-хозяину, трансформированной с помощью полинуклеотидной векторной модели настоящего изобретения. Клетка-хозяин может быть как прокариотической, так и эукариотической. Бактериальные клетки могут быть предпочтительно прокариотическими клетками-хозяевами в некоторых случаях и типично являются штаммом *E. coli*, таким как, например, *E. coli* штамма DH5, имеющимся в наличии в Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, США, и RR1, имеющимся в наличии в Американской коллекции типов культур American Type Culture Collection (ATCC) of Rockville, MD, США (№ ATCC 31343). Предпочтительные эукариотические клетки-хозяева включают дрожжи, клетки насекомых и млекопитающих, предпочтительно клетки позвоночных, таких как мышь, крыса, обезьяна или человеческие фибробластные клетки и клеточные линии толстого кишечника. Дрожжевые клетки-хозяева включают YPH499, YPH500 и YPH501, которые, как правило, имеются в наличии в Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, США. Предпочтительные клетки-хозяева млекопитающих включают клетки яичника китайского хомяка (CHO), имеющиеся в наличии в ATCC как CCL61, NTN эмбриональные клетки швейцарской мыши NIH/3T3, имеющиеся в наличии в ATCC как CRL 1658, почечные клетки обезьяны COS-1, имеющиеся в наличии в ATCC как CRL 1650, и клетки 293, являющиеся эмбриональными клетками печени человека. Предпочтительными клетками насекомых являются клетки Sf9, которые могут трансфецироваться с помощью бакуловирусных векторов экспрессии. Обзор в отношении выбора подходящих клеток-хозяев для экспрессии представлен, например, в пособии авторов Paulina Balbas и Argelia Lorence "Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols", часть первая, второе издание, ISBN 978-1-58829-262-9 и другой литературе, известной специалисту данной области.

Трансформация адекватных клеток-хозяев с помощью модели ДНК настоящего изобретения совершается при помощи хорошо известных способов, которые обычно зависят от типа используемого век-

тора. Относительно трансформации прокариотических клеток-хозяев см., например, Cohen и соавторы (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2110 и Sambrook и соавторы (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Нью-Йорк. Трансформация дрожжевых клеток описывается у Sherman и соавторов (1986) Methods In Yeast Genetics, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Нью-Йорк. Также подходит метод Бигса (Beggs) (1978) Nature 275,104-109. Что касается клеток позвоночных, то подходящие для трансфекции таких клеток реагенты, например фосфат кальция и DE-АЕ-декстран или липосомальные составы, имеются в наличии в Stratagene Cloning Systems или Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD 20877, США. Электропорация также подходит для трансформации и/или трансфекции клеток и хорошо известна из уровня техники для трансформации дрожжевых клеток, бактериальных клеток, клеток насекомых и клеток позвоночных.

Успешно трансформированные клетки, т.е. клетки, которые содержат конструкцию ДНК настоящего изобретения, могут быть идентифицированы хорошо известными способами, такими как ПЦР. Альтернативно наличие белка в супернатанте может выявляться применением антител.

Следует понимать, что некоторые клетки-хозяева по изобретению подходят для получения пептидов по изобретению, например бактериальные, дрожжевые клетки и клетки насекомых. Тем не менее, другие клетки-хозяева могут быть пригодны в конкретные терапевтических методах. Например, антигенпрезентирующие клетки, такие как дендритные клетки, могут с пользой быть использованы для экспрессии пептидов по изобретению так, что их можно будет нагружать на адекватные молекулы МНС. Таким образом, актуальное изобретение обеспечивает клетку-хозяина, включающую нуклеиновую кислоту или вектор экспрессии в соответствии с изобретением.

В предпочтительном воплощении клетка-хозяин является антигенпрезентирующей клеткой, в частности дендритной клеткой или антигенпрезентирующей клеткой. АПК, нагруженные рекомбинантным белком слияния, содержащим простатическую кислоту фосфатазу (PAP), на данный момент проходят исследования в целях лечения рака простаты (Sipuleucel-T) (Small E.J. et al. 2006; Rini et al., 2006).

Дальнейший аспект изобретения обеспечивает способ получения пептида или его варианта; способ, включающий культивацию клетки-хозяина и изоляцию пептида из клетки-хозяина или его культуральной среды.

В другом воплощении пептид, нуклеиновая кислота или вектор экспрессии по изобретению используются в медицине. Например, пептид или его вариант может приготавливаться для внутривенной (i.v.) инъекции, подкожной (s.c.) инъекции, внутривоковой (i.d.) инъекции, внутрибрюшной (i.p.) инъекции, внутримышечной (i.m.) инъекции. Предпочтительные способы пептидной инъекции включают s.c., i.d., i.p., i.m. и i.v. Предпочтительные способы инъекции ДНК включают i.d., i.m., s.c., i.p. и i.v. Вводятся могут дозы, к примеру, между 50 мкг и 1,5 мг, предпочтительно от 125 до 500 мкг пептида или ДНК и будут зависеть от соответствующего пептида или ДНК. Дозы в данных пределах успешно использовались в предыдущих клинических исследованиях (Brunsvig et al., 2006; Staehler et al., 2007).

Другой аспект настоящего изобретения включает способ получения активированных Т-клеток *in vitro*; способ, включающий контактирование Т-клеток *in vitro* с нагруженными антигеном молекулами МНС I или II класса человека, экспрессированными на поверхности подходящей антигенпрезентирующей клетки на период времени, достаточного для активации антигенспецифическим образом Т-клетки, где антиген является пептидом в соответствии с изобретением. Предпочтительным образом достаточное количество антигена используется с антигенпрезентирующей клеткой.

В случае эпитопа МНС класса II, используемого в качестве антигена, Т-клетки являются CD4-положительными хелперными клетками, предпочтительным образом типа T_{H1}. Молекулы МНС класса II могут быть экспрессированы на поверхности любой подходящей клетки. Предпочтительно, если клетка в естественных условиях не экспрессирует молекулы МНС класса II (в этом случае клетка трансфицирована для экспрессии такой молекулы). Альтернативно, если клетка в естественных условиях экспрессирует молекулы МНС класса II, то предпочтительно, чтобы клетка была дефектной для сигнальных путей процессинга или презентации антигена. Тогда на клетку, экспрессирующую молекулы МНС класса II, возможна полная погрузка выбранного пептидного антигена до активации Т-клетки.

Антигенпрезентирующая клетка (или клетка-стимулятор) типично имеет молекулы МНС класса II на своей поверхности и предпочтительно обычно является не способной самостоятельно нагружать на указанную молекулу МНС класса II выбранный антиген. Молекула МНС II класса может быть легко нагружена выбранным антигеном *in vitro*.

Предпочтительно, если в клетке млекопитающих не хватает или имеется пониженный уровень или пониженная функция пептидного транспортера TAP. Подходящие клетки, в которых не хватает пептидного транспортера TAP, включают T2, RMA-S и клетки дрозофилы. TAP - это транспортер, ассоциированный с процессингом антигена.

Нагружающая пептидом дефектная клеточная линия T2 человека имеется в наличии в American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, США под каталоговым № CRL 1992; клеточная линия дрозофилы линия Schneider 2 имеется в наличии в ATCC под каталоговым № CRL 19863; клеточная линия мыши RMA-S описывается у Karre и соавторов, 1985.

Обычно указанная клетка-хозяин до трансфекции в основном не экспрессирует молекулы МНС I

класса. Также предпочтительно, если клетка-стимулятор экспрессирует молекулу, важную для обеспечения сигнала костимуляции для Т-клеток, такую как любая из B7.1, B7.2, ICAM-1 и LFA 3. Последовательности нуклеиновой кислоты многочисленных молекул МНС II класса и костимулирующих молекул общедоступны в банках данных GenBank и EMBL.

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

Если антигенпрезентирующая клетка трансфецирована для экспрессии такого эпитопа, то предпочтительно, чтобы клетка включала вектор экспрессии, способный экспрессировать пептид, содержащий SEQ ID № 1 по SEQ ID № 11 или их вариантную аминокислотную последовательность.

Для генерации ЦТЛ *in vitro* могут быть использованы многие другие способы. Например, в методах, описанных у Peoples и соавторов (1995) и Kawakami и соавторов (1992), используются аутологичные опухольинфильтрующие лимфоциты при генерации ЦТЛ. Для приготовления ЦТЛ Plebanski и соавторы (1995) используют аутологичные лимфоциты периферической крови (ЛПК). Jochmus и соавторы (1997) описывают получение аутологичных ЦТЛ посредством импульсного введения пептида или полипептида в дендритные клетки или посредством инфицирования рекомбинантным вирусом. Hill и соавторы (1995) и Jegome и соавторы (1993) для получения аутологичных ЦТЛ используют В-клетки. Кроме того, для получения аутологичных ЦТЛ могут быть использованы макрофаги с введенным импульсным методом пептидом или полипептидом или инфицированные рекомбинантным вирусом. S. Walter и соавторы 2003 описывают прайминг Т-клеток *in vitro* с использованием искусственных антигенпрезентирующих (аАПК) клеток, что является также подходящим способом генерации Т-клеток против выбранного пептида. В данном исследовании аАПК были генерированы при соединении преформированных комплексов МНС/пептид с поверхностью полистироловых частиц (микрошарики) с помощью биохимического способа с биотином/стрептавидином. Данная система допускает точный контроль плотности МНС на аАПК, который позволяет селективно вызвать высоко- или низкоavidные антигенспецифические Т-клеточные ответы с высокой эффективностью из проб крови. Кроме комплексов МНС/пептид аАПК должны нести другие белки с костимулирующей активностью, такие как антитела анти-CD28, соединенные с их поверхностью. Кроме того, такая основанная на аАПК система часто требует добавления адекватных растворимых факторов, к примеру, цитокинов, таких как интерлейкин-12.

При получении Т-клеток могут быть также использованы аллогенные клетки, и метод детально описывается в патенте WO 97/26328, включенном сюда путем ссылки. Например, кроме клеток дрозифилы и Т2-клеток, для презентации антигенов могут использоваться другие клетки, такие как клетки ячника китайского хомяка (СНО), бакуловирусицированные клетки насекомых, бактерии, дрожжи, инфицированные осповакциной клетки-мишени. Кроме того, могут быть использованы растительные вирусы (см., например, работу Porta et al. (1994)), которая описывает развитие мозаичного вируса китайской вигны как высокопродуктивную систему для презентации чужеродных пептидов.

Активированные Т-клетки, которые направлены против пептидов изобретения, полезны в терапии. Таким образом, дальнейший аспект изобретения обеспечивает активированные Т-клетки, получаемые вышеупомянутыми методами по изобретению.

Активированные Т-клетки, полученные с помощью приведенного выше способа, будут селективно распознавать клетку, которая aberrантно экспрессирует полипептид, включающий аминокислотную последовательность с SEQ ID № 1 по SEQ ID № 11.

Предпочтительно, чтобы Т-клетка распознавала клетку при взаимодействии посредством ее ТКР с комплексом HLA/пептид (например, соединение). Т-клетки полезны в способе уничтожения клеток-мишеней у пациента, клетки-мишени которого aberrантно экспрессируют полипептид, включающий аминокислотную последовательность по изобретению, где пациенту вводится эффективное число активированных Т-клеток. Т-клетки, которые введены пациенту, могут быть получены от пациента и активироваться, как описывалось выше (т.е. они являются аутологичными Т-клетками). Альтернативно Т-клетки получают не от пациента, а от другого индивида. Разумеется, предпочтительно, если индивид является здоровым индивидом. "Здоровым индивидом" изобретатели обозначают, что индивид имеет, в общем, хорошее здоровье, предпочтительно он имеет компетентную иммунную систему и более предпочтительно не страдает ни одним заболеванием, которые можно легко проконтролировать и выявить.

Клетками-мишенями для CD4-положительных Т-клеток *in vivo* в соответствии с настоящим изобретением могут быть клетки опухоли (которые иногда экспрессируют МНС класса II) и/или стромальные клетки, окружающие опухоль (опухолевые клетки) (которые иногда также экспрессируют МНС класса II); (Dengjel et al., 2006)).

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

Под понятием "aberrантно экспрессированный" изобретатели понимают, что полипептид гиперэкспрессирован по сравнению с нормальными уровнями экспрессии, или что ген является "молчащим" в

ткани, из которой образовалась опухоль, однако он экспрессирован в опухоли. Под понятием "гиперэкспрессирован" изобретатели понимают, что полипептид представлен на уровне, который по крайней мере в 1,2 раза выше уровня, представленного в нормальной ткани; предпочтительно по крайней мере в 2 раза и более предпочтительно по крайней мере в 5 или 10 раз выше уровня, представленного в нормальной ткани.

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

Протоколы для этого т.н. адоптивного переноса Т-клеток хорошо известны из уровня техники, и с ними можно ознакомиться, например, в работах (Rosenberg et al., 1987; Rosenberg et al., 1988; Dudley et al., 2002; Yee et al., 2002; Dudley et al., 2005); обобщение (Gattinoni et al., 2006) и (Morgan et al., 2006).

Любая молекула по изобретению, т.е. пептид, нуклеиновая кислота, вектор экспрессии, клетка, активированные ЦТЛ, Т-клеточный рецептор или нуклеиновая кислота, кодирующая его, полезна для лечения нарушений, характеризующихся ускользанием клеток от иммунного ответа. Поэтому любая молекула настоящего изобретения может применяться в качестве медикамента или при изготовлении медикамента. Молекула может быть использована сама по себе или в комбинации с другой(ими) молекулой(ами) по изобретению или известной(ыми) молекулой(ами).

Предпочтительно, если медикамент настоящего изобретения является вакциной. Она может вводиться непосредственно пациенту в пораженный орган или систематично *i.d.*, *i.m.*, *s.c.*, *i.p.* и *i.v.* или вноситься *ex vivo* в клетки, полученные от пациента, или в человеческую клеточную линию, которые затем могут вводиться пациенту или использоваться *in vitro* для селекции субпопуляции из иммунных клеток, полученных от пациента, которые после этого вновь вводятся пациенту. Если нуклеиновая кислота введена в клетки *in vitro*, то может быть полезно, чтобы клетки были трансфицированными, чтобы коэкспрессировать иммуностимулирующие цитокины, такие как интерлейкин-2. Пептид может быть, по существу, чистым или комбинированным с иммуностимулирующим адьювантом (см. ниже) или использоваться в комбинации с иммуностимулирующими цитокинами или вводиться с подходящей системой доставки, например липосомами. Пептид может быть также конъюгирован с подходящим носителем, таким как гемоцианин лимфы улитки (KLH) или маннан (см. WO 95/18145 и Longenecker et al. (1993)). Пептид может быть также меченым, или может быть белком слияния, или гибридной молекулой. Пептиды, последовательность которых дана в настоящем изобретении, как ожидается, стимулируют Т-клетки CD4 или CD8. Тем не менее, стимуляция CD8 ЦТЛ более эффективна в присутствии помощи, производимой CD4 хелперными Т-клетками. Таким образом, для эпитопов МНС I класса, которые стимулируют CD8 ЦТЛ, партнеры слияния или секции гибридной молекулы адекватно обеспечивают эпитопы, которые стимулируют CD4-положительные Т-клетки. CD4- и CD8-стимулирующие эпитопы хорошо известны из уровня техники и включают те, что были идентифицированы в настоящем изобретении.

В одном аспекте вакцина включает по крайней мере один пептид, предпочтительно от двух до 50, более предпочтительно от двух до 25, еще более предпочтительно от двух до 15 и наиболее предпочтительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 пептидов.

Пептид(ы) может(могут) быть образован(ы) из одного или более специфических ТАА и может(могут) связываться с молекулами МНС класса I и/или класса II.

Полинуклеотид может быть, по существу, чистым или содержаться в подходящем векторе или системе доставки. Нуклеиновая кислота может быть ДНК, κДНК, ПНК, ЦНК (циклогексанилнуклеиновая кислота), РНК или их комбинацией. Методы конструирования и введения такой нуклеиновой кислоты хорошо известны из уровня техники. Обзор представлен, к примеру, в работах Pascolo S., 2006; Stan R., 2006 или A Mahdavi, 2006. Полинуклеотидные вакцины легки в приготовлении, однако способ действия этих векторов по индуцированию иммунного ответа понят не полностью. Подходящие векторы и системы доставки включают вирусные ДНК и/или РНК, такие как системы, которые основаны на аденовирусе, вирусе осповакцины, ретровирусах, вирусе герпеса, аденоассоциированном вирусе или гибридах, содержащих элементы более чем одного вируса. Невирусные системы доставки включают катионные липиды и катионные полимеры и хорошо известны из уровня техники в области доставки ДНК. Также может быть использована физическая доставка, такая как посредством "ген-пистолета". Пептид или пептиды, закодированные нуклеиновой кислотой, могут быть белком слияния, например, с эпитопом, который стимулирует Т-клетки для соответствующего противоположного гипервариабельного участка (CDR), как описывается выше.

Медикамент по изобретению может также включать один или более адьювант. Адьюванты - это вещества, которые неспецифически усиливают или потенцируют иммунный ответ (например, иммунные ответы, опосредованные ЦТЛ или хелперными Т-клетками (Тн)) на антиген, и могут, таким образом, рассматриваться как полезные в медикаменте настоящего изобретения. Подходящие адьюванты включают, но не ограничиваются, 1018 ISS, соли алюминия, AmpliVax, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, Су-аА, dSLIM, флагеллин или лиганды TLR5, полученные из флагеллина, лиганд FLT3, ГМ-КСФ, IC30, IC31, имиквимод (ALDARA), ImuFact IMP321, интерферон-альфа или бета или их пегилированные производные, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, ISCOMs, JuvImmune, LipoVac, MALP2, MF59, монофосфорил липид А, монтанид IMS 1312, монтанид ISA 206, монтанид ISA 50V, монтанид ISA-51, эмульсии "вода в

масле" и "масло в воде", ОК-432, ОМ-174, ОМ-197-МР-ЕС, ОНТАК, OspA, векторная система RepTel®, микрочастицы PLG и декстрана, резиквимод, SRL172, вирусомы и другие вирусоподобные частицы, YF-17D, VEGF trap, R848, бета-глюкан, Pam3Cys, стимулон Aquila QS21, который получают из сапонина, микобактериальные экстракты и синтетические имитации бактериальных клеточных стенок и другие запатентованные адъюванты, такие как Ribi's Detox, Quil или Superfos. Предпочтительными адъювантами являются такие, как адъювант Фрейнда или ГМ-КСФ. Несколько иммунологических адъювантов (например, MF59), специфических для дендритных клеток, и их приготовление были описаны ранее (Dupuis M. et al., 1998; Allison 1998). Также могут использоваться цитокины. Несколько цитокинов были присоединены напрямую для оказания влияния на миграцию дендритных клеток к лимфоидным тканям (например, TNF-альфа), ускоряя созревание дендритных клеток до эффективных презентующих антиген Т-лимфоцитам клеток (например, ГМ-КСФ, ИЛ-1 и ИЛ-4) (патент США № 5849589, специфически включенный сюда в его целостности путем ссылки) и действуя как иммуноадъюванты (например, ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-23, ИЛ-7, IFN-альфа, IFN-бета) (Gabrilovich et al., 1996).

Об иммуностимулирующих олигонуклеотидах CpG также сообщалось, что они усиливают эффекты адъювантов в составе вакцин. Теоретически не связанные CpG-олигонуклеотиды при активации врожденной (неадаптивной) иммунной системы действуют с помощью Toll-подобных рецепторов (TLR), в основном TLR9. Вызванная CpG активация TLR9 усиливает антигенспецифические гуморальные и клеточные ответы на широкий спектр антигенов, включая пептидные или белковые антигены, живые или убитые вирусы, вакцины из дендритных клеток, аутологичные клеточные вакцины и полисахаридные конъюгаты как в профилактических, так и терапевтических вакцинах. Более важно то, что улучшается созревание и дифференциация дендритных клеток, приводя к улучшенной активации T_{H1} -клеток и интенсивной генерации цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) даже при отсутствии помощи CD4 Т-клеток. Отклонение в сторону T_{H1} , вызванное стимуляцией TLR9, сохраняется даже в присутствии вакцинных адъювантов, таких как квасцы или неполный адъювант Фрейнда (IFA), который обычно способствует отклонению в сторону T_{H2} . CpG-олигонуклеотиды проявляют даже большую адъювантную активность, если они входят в состав или вводятся вместе с другими адъювантами или в таких составах, как микрочастицы, наночастицы, липидные эмульсии, или подобных составах, которые в особенности необходимы для инициации сильного ответа, если антиген относительно слаб. Они также ускоряют иммунную реакцию и позволяют снизить дозы антигена на приблизительно два порядка величины с ответами антитела, сравнимыми с полной дозой вакцины без CpG в некоторых экспериментах (Krieg et al., 2006). В патенте США № 6406705 В1 описывается комбинированное применение CpG-олигонуклеотидов, адъювантов, не включающих нуклеиновые кислоты, и антигена для вызывания антигенспецифического иммунного ответа. Антагонистом CpG TLR9 является dSLIM (контурный иммуномодулятор двойного действия) компании "Mologen" (Берлин, Германия), который является предпочтительным компонентом фармацевтической композиции настоящего изобретения. Также могут быть использованы другие молекулы, связывающиеся с TLR, такие как РНК, связывающаяся с TLR 7, TLR 8 и/или TLR 9.

Другие примеры полезных адъювантов включают, но не ограничиваются химически модифицированные CpG (например, CpR, Idera), аналоги dsРНК, такие как Poly(I:C) и AmpliGen, не-CpG бактериальные ДНК или РНК, а также иммуноактивные малые молекулы и антитела, такие как циклофосфамид, сунитиниб, бевацизумаб, целебрекс, NCX-4016, силденафил, тадалафил, варденафил, сорафениб, темозоломид, темсиrolimus, XL-999, CP-547632, пазопаниб, VEGF Trap, ZD2171, AZD2171, анти-CTLA4 и SC58175, которые могут действовать терапевтически и/или как адъювант. Количества и концентрации адъювантов и вспомогательных веществ, полезных в контексте настоящего изобретения, могут быть легко определены опытным специалистом без проведения излишних экспериментов. Предпочтительными адъювантами являются dSLIM, интерферон-альфа, -бета, CpG7909, IC31, ALDARA (имиквимод), Rev1Ter, RNA, тадалафил, темозоломид и JuvImmune.

Настоящее изобретение обеспечивает медикамент, который полезен в лечении рака, в частности рака, связанного с нейронами, в частности рака головного мозга. Рак может быть метастатическим или метастатическим, в частности, он может быть астроцитомой, пилоидной астроцитомой, дисэмбриопластической нейроэпителиальной опухолью, олигодендроглиомой, эпендимомой, мультиформной глиобластомой, смешанными глиомами, олигоастроцитомами, медуллобластомой, ретинобластомой, нейробластомой, герминомой, тератомой, ганглиоглиомой, ганглиоцитомой, центральной ганглиоцитомой, примитивными нейроэктодермальными опухолями (PNET, к примеру, медуллобластома, медуллоэпителиома, нейробластома, ретинобластома, эпендимобластома), опухолями паренхимы шишковидной железы (к примеру, пинеоцитомы, пинеобластома), опухолями, развивающимися из эпендимных клеток, опухолями хориоидного сплетения, нейроэпителиальными опухолями неопределенного происхождения (к примеру, глиоматоз мозга, астробластома), глиобластомой, раком легких или аденосквамозной карциномой.

Так как пептиды по изобретению были изолированы из глиобластомы и в случае SEQ ID № 2 также из аденосквамозной карциномы, то медикамент по изобретению предпочтительно применяется для лечения глиобластомы или аденосквамозной карциномы.

Настоящее изобретение включает вспомогательное оборудование, включающее (а) контейнер, содержащий фармацевтическую композицию, описанную выше, в виде раствора или в лиофилизованной

форме; (b) опционально - второй контейнер, содержащий разбавитель или восстанавливающий раствор для лиофилизованного состава; и (c) опционально - инструкции по (i) применению раствора или (ii) восстановителя и/или по применению лиофилизованного состава. В дальнейшем оборудование может включать один или более (iii) буфер, (iv) разбавитель, (v) фильтр, (vi) иглу или (vii) шприц. Контейнер является предпочтительно флаконом, ампулой, шприцем или пробиркой; и он также может быть контейнером многоразового использования. Фармацевтическая композиция предпочтительно лиофилизована.

Вспомогательное оборудование настоящего изобретения предпочтительно включает лиофилизованный состав настоящего изобретения в подходящем контейнере и инструкции для ее восстановления и/или по ее применению. Подходящие контейнеры включают, например, флаконы, ампулы (например, двухкамерные ампулы), шприцы (такие как двухкамерные шприцы) и пробирки. Контейнер может быть сделан из разнообразных материалов, таких как стекло или пластик. Предпочтительным образом вспомогательное оборудование и/или контейнер содержат инструкции для, или связанные с контейнером, которые дают указания для восстановления и/или применения. Например, на этикетке может быть указано, что лиофилизованный состав должен восстанавливаться до пептидных концентраций, как те, что описаны выше. На этикетке в дальнейшем может быть указано, что состав применяется или предназначается для подкожного введения.

Контейнер с составом может быть ампулой многоразового использования, которая позволяет повторное введение (например, от 2-6 введений) восстановленного состава. Вспомогательное оборудование может включать в дальнейшем второй контейнер, включающий подходящий разбавитель (например, раствор бикарбоната натрия).

При смешивании разбавителя и лиофилизованного состава окончательная концентрация пептида в восстановленном составе составляет предпочтительно по крайней мере 0,15 мг/мл/пептид (=75 мкг) и предпочтительно не более чем 3 мг/мл/пептид (=1500 мкг). Вспомогательное оборудование может в дальнейшем включать другие материалы, желательные с коммерческой и с точки зрения пользователя, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и упаковочные вкладыши с инструкциями по применению.

Вспомогательное оборудование настоящего изобретения может иметь один контейнер, который содержит состав фармацевтических композиций в соответствии с настоящим изобретением с или без других компонентов (например, других соединений или фармацевтических композиций этих других соединений) или может иметь отдельные контейнеры для каждого компонента.

Вспомогательное оборудование по изобретению предпочтительно включает состав по изобретению, укомплектованный для применения в комбинации с ко-введением второго соединения (такого как адьюванты (например, ГМ-КСФ), химиотерапевтического средства, натурального продукта, гормона или антагониста, средства против ангиогенеза или ингибитора; апоптозиндуцирующего средства или хелатора) или их фармацевтической композиции. Компоненты вспомогательного оборудования до введения пациенту могут предварительно быть организованы в комплекс, или же каждый компонент может находиться в отдельном отличном контейнере. Компоненты вспомогательного оборудования могут обеспечиваться одним или несколькими жидкостными растворами, предпочтительно водным раствором, более предпочтительно стерильным водным раствором. Компоненты вспомогательного оборудования могут также обеспечиваться твердой формой, которая может быть превращена в жидкости при добавлении подходящих растворителей, которые предпочтительным образом предоставляются в другом, отличном, контейнере.

Контейнер терапевтического оборудования может быть ампулой, пробиркой, колбой, флаконом, шприцем или любыми другими средствами, заключающими в себе твердое вещество или жидкость. Обычно, если имеются более одного компонента, оборудование содержит вторую ампулу или другой контейнер, который позволяет отдельную дозировку. Оборудование может также содержать другой контейнер для фармацевтически приемлемой жидкости. Терапевтическое оборудование будет предпочтительно содержать приспособление (например, одну или более иглу, шприцы, пипетки для глаз, пипетки и т.д.), которое позволяет введение веществ по изобретению, которые являются компонентами настоящего оборудования.

Настоящий состав подходит для введения пептидов любым приемлемым способом, таким как оральный (энтеральный), назальный, офтальмальный, подкожный, внутривенный, внутримышечный, внутримышечный или трансдермальный. Предпочтительно, чтобы введение было s.c. и наиболее предпочтительно i.d. Введение может производиться инфузионным насосом.

Теперь настоящее изобретение будет описано с помощью последующих примеров, которые описывают его предпочтительные воплощения, тем не менее, не ограничивая ими изобретение. В соответствии с целями настоящего изобретения все цитаты описания включены в их целостности путем ссылки.

Примеры

Пример 1. Идентификация опухолеассоциированных пептидов (TUMAPs), презентуемых на поверхности клетки.

Пробы тканей.

Опухолевые и здоровые ткани пациентов были предоставлены клиниками Hoptal Cantonal Universi-

taire de Geneve, г. Женева (Medical Oncology Laboratory of Tumor Immunology) и Neurochirurgische Universitäts-Klinik г. Гейдельберг, Германия (молекулярно-биологическая лаборатория). Перед проведением хирургического вмешательства было получено информированное согласие всех пациентов в письменной форме. Сразу же после операции ткани были подвергнуты шоковой заморозке в жидком азоте и хранились до изоляции TUMAPs при -80°C .

Изоляция пептидов HLA из проб тканей.

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

Детекция пептидов TUMAPs масс-спектрометрическим анализом с ESI-жидкостной хроматографией (ESI-LCMS).

Метод первый.

Полученные пулы пептидов HLA были разделены в соответствии с гидрофобностью обратнофазной хроматографией (CapLC, Waters), и элюированные пептиды анализировали на гибридном квадрупольном времяпролетном тандемном масс-спектрометре с ортогональным ускорением ионов (Q-TOF Ultima, Waters), снабженном источником ESI. Пептидные пулы наносили на предколонку C18 для концентрирования и опреснения. После нанесения предколонку помещали в линию для разделения с помощью микрокапиллярной колонки из плавленного кварца (75 мкм i.d.×250 мм) с обратнофазным материалом C18 в 5 мкм (Dionex). Растворителем А был ацетат аммония/вода, 4 мМ. Растворителем В были 2 мМ ацетата аммония в 80% ацетонитрил/вода. В обоих растворителях был установлен уровень pH в 3,0 муравьиной кислотой. Был сформирован бинарный градиент от 15 до 60% В в течение 90 мин с применением скорости потока в 5 мкл/мин, сниженного до приблизительно 200 нл/мин с помощью распределительной системы. Позолоченный стеклянный капилляр (PicoTip, New Objective) использовали для введения в источник микро-ESI. Временем интеграции для TOF-анализатора было 1,9 с с временем задержки между измерениями в 0,1 с. Затем определяли последовательности пептидов анализом индуцированного столкновением (CID) масс-спектра (ESI-LCMS/MS). Идентифицированную последовательность пептида TUMAP подтверждали сравнением генерированного фрагментационного образца естественного пептида TUMAP с фрагментационным образцом синтетического сравниваемого пептида с идентичной последовательностью.

Метод второй.

Полученные пулы пептидов HLA были разделены в соответствии с их гидрофобностью обратнофазной хроматографией (Acquity UPLC system, Waters), и элюированные пептиды анализировали на гибридном масс-спектрометре LTQ-Orbitrap (ThermoElectron), снабженном источником ESI. Пулы пептидов наносили непосредственно на аналитическую микрокапиллярную колонку из плавленного кварца (75 мкм i.d.×250 мм) с обратнофазным материалом 1,7 мкм C18 (Waters) с применением скорости потока в 400 нл в минуту. Затем пептиды разделяли с использованием двухэтапного 180-минутного бинарного градиента от 10 до 33% В при скорости потока в 300 нл в минуту. Градиент был составлен из растворителя А (0,1% муравьиной кислоты в воде) и растворителя В (0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле). Позолоченный стеклянный капилляр (PicoTip, New Objective) использовали для введения в источник микро-ESI. Масс-спектрометр LTQ-Orbitrap работал в зависимом от данных режиме с применением стратегии TOP5. Вкратце, цикл сканирования начинался с полного сканирования с высокой точностью масс на спектрометре Orbitrap ($R=30000$), за чем следовало сканирование MS/MS на Orbitrap ($R=7500$) на 5 особенно многочисленных ионах-предшественниках с динамическим исключением отобранных ранее ионов. Тандемные масс-спектры интерпретировали на SEQUEST с дополнительным ручным управлением. Идентифицированную последовательность пептида TUMAP подтверждали сравнением генерированного фрагментационного образца естественного пептида TUMAP с фрагментационным образцом синтетического контрольного пептида с идентичной последовательностью. На фиг. 1a и 1b представлены отдельные масс-спектры, полученные для опухолевой ткани для ассоциированных с MHC класса I пептидов TUMAPs.

Пример 2. Определение профиля экспрессии генов, кодирующих пептиды по изобретению.

Не все пептиды, идентифицированные как презентруемые на поверхности опухолевых клеток молекулами MHC, подходят для иммунотерапии, потому что большинство этих пептидов образованы из нормальных клеточных белков, экспрессируемых многими видами клеток. Только немногие из этих пептидов являются опухолеассоциированными и, скорее всего, способны индуцировать Т-клетки с высокой специфичностью распознавания опухоли, из которой они были образованы. В целях идентификации таких пептидов и минимизации риска аутоиммунитета, вызванной при вакцинации, изобретатели фокусировали свое внимание на тех пептидах, которые образованы из белков, гиперэкспрессированных на опухолевых клетках в сравнении с большинством нормальных тканей.

Идеальный пептид будет образован из белка, являющегося уникальным для опухоли и не присутст-

вующего ни в одной другой ткани. Для идентификации пептидов, которые образованы из генов с профилем экспрессии, похожим на идеальный, идентифицированные пептиды соотносили с белками и генами, из которых они были образованы и генерировали экспрессионные профили этих генов.

Источники РНК и приготовление.

Хирургически удаленные тканевые препараты были предоставлены двумя различными клиническими центрами (см. табл.1) после получения формы информированного согласия от каждого пациента. Препараты опухолевой ткани были мгновенно заморожены в жидком азоте после операции и впоследствии гомогенизированы с помощью ступки и пестика в жидком азоте. Суммарная РНК была приготовлена из данных проб с использованием TRIzol (Invitrogen, Karlsruhe, Германия) с последующей очисткой на RNeasy (QIAGEN, Hilden, Германия); оба метода осуществлялись в соответствии с указаниями производителей.

Суммарная РНК здоровых человеческих тканей была куплена (Ambion, Huntingdon, Великобритания; Clontech, Heidelberg, Германия; Stratagene, Amsterdam, Нидерланды; BioChain, Hayward, CA, США). РНК нескольких индивидов (от двух до 123 индивидов) была смешана таким образом, что РНК каждого индивида имела равный вес. Лейкоциты были изолированы из проб крови 4 здоровых добровольцев.

Качество и количество проб суммарной РНК были подтверждены на биоанализаторе Agilent 2100 (Agilent, Waldbronn, Германия) с использованием лабораторного оборудования RNA 6000 Pico LabChip Kit (Agilent).

Эксперименты с микрочипами.

Анализ экспрессии генов всех проб РНК из опухолевой и нормальной ткани был произведен с помощью олигонуклеотидных микрочипов Affymetrix Human Genome (HG) U133A или HG-U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, США). Все этапы были выполнены в соответствии с руководством Affymetrix (http://www.affymetrix.com/support/technical/manual/expression_manual.affx). Вкратце, двухнитевую кДНК синтезировали из 5-8 мкг суммарной РНК с использованием Superscript RTII (Invitrogen) и олиго-dT-T7 праймера (MWG Biotech, Ebersberg, Германия), как описывается в руководстве. Транскрипцию *in vitro* производили на BioArray High Yield RNA Transcript Labelling Kit (ENZO Diagnostics, Inc., Farmingdale, NY, США) for the U133A arrays or with the GeneChip IVT Labelling Kit (Affymetrix) для микрочипов U133 Plus 2.0 с последующей фрагментацией, гибридизацией кРНК и окрашиванием стрептавидин-фикоэритрином и биотинилированным антистрептавидиновым антителом (Molecular Probes, Leiden, Нидерланды). Изображения сканировали на Agilent 2500A GeneArray Scanner (U133A) или Affymetrix GeneChip Scanner 3000 (U133 Plus 2.0), а данные анализировали в программе GCOS (Affymetrix) с использованием настроек по умолчанию для всех параметров. Для нормализации использовали 100 генов "домашнего хозяйства", предоставленных Affymetrix (http://www.affymetrix.com/support/technical/mask_files.affx). Относительные значения экспрессии были подсчитаны с показаний сигнальной программы, и значение нормальной пробы было произвольно задано значением 1,0.

Экспрессионный профиль исходного гена всех пептидов настоящего изобретения (PTPRZ1) свидетельствует о высокой экспрессии в опухолевой ткани глиобластомы, в то время как ген не экспрессирован или экспрессирован на очень низких уровнях в нормальных тканях (фиг. 2).

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

Прайминг *in vitro* CD8⁺ Т-клеток.

В целях проведения стимуляций *in vitro* искусственных антигенпрезентирующих клеток (аАПК), нагруженных комплексом пептид-МНС (рМНС) и антителом анти-CD28, изобретатели сначала изолировали МПК (моноциты периферической крови) из свежей лейкоцитарной пленки HLA-A*02+ с использованием стандартной среды для градиентного разделения (РАА, Colbe, Германия). Лейкоцитарные пленки были получены из госпиталя "Katharinenhospital" г. Штутгарта. Изолированные МПК инкубировали в течение ночи в Т-клеточной среде (ТСМ) для прайминга человеческого материала *in vitro*, состоящей из RPMI-Glutamax (Invitrogen, Karlsruhe, Германия), с добавлением 10%-ной инактивированной нагреванием человеческой сыворотки АВ (РАА, Colbe, Германия), 100 U/мл пенициллина/100 мкг/мл стрептомицина (Cambrex, Verviers, Бельгия), 1 мМ пирувата натрия (СС Pro, Neustadt, Германия) и 20 мкг/мл гентамицина (Cambrex). Лимфоциты CD8⁺ были изолированы с использованием CD8⁺ MACS - оборудования для положительного отбора (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Германия) в соответствии с указаниями производителя. Полученные CD8⁺ Т-клетки инкубировали до использования в ТСМ с добавлением 2,5 нг/мл ИЛ-7 (PromoCell, Heidelberg, Германия) и 10 U/мл ИЛ-2 (Chiron, Munich, Германия). Получение покрытых гранул рМНС/анти-CD28, Т-клеточные стимуляции и считывание производили, как описывалось ранее (Walter et al., 2003), с минимальными модификациями. Вкратце, биотинилированные рекомбинантные молекулы HLA-A*0201, в которых не хватает трансмембранного домена и которые были биотинилированы на карбоксильном конце тяжелой цепи, были получены в соответствии с методом, описанным в работе (Airman et al., 1996). Очищенный костимулированный мышинный IgG2a к антителам человека CD28 Ab 9.3 (Jung et al., 1987) был химически биотинилирован с использованием сульфо-N-гидроксисукцинимидобиотина, как рекомендуется изготовителем (Perbio, Bonn, Германия). Использованные гранулы были покрыты стрептавидином полистироловыми частицами величиной 5,60 мкм (Bangs Laboratories, Illinois/США). рМНС, использованные в качестве положительных и отрицательных

контролей, были А*0201/MLA-001 (пептид ELAGIGILTV из модифицированного Melan-A/MART-1) и А*0201/DDX5-001 (YLLPAIVNI из DDX5) соответственно.

800000 гранул/200 мкл были покрыты в 96-луночном планшете в присутствии 600 нг биотина анти-CD28 и 200 нг релевантного биотин-рМНС (высокоплотные гранулы) или 2 нг релевантного и 200 нг нерелевантного (библиотека рМНС) МНС (низкоплотные гранулы). Стимуляции были инициированы в 96-луночных планшетах при ко-инкубации 1×10^6 CD8+ Т-клеток с 2×10^5 промытых покрытых гранул в 200 мкл ТСМ с добавлением 5 нг/мл ИЛ-12 (PromoCell) в течение 3-4 дней при 37°C. Половина среды была заменена на свежую ТСМ с добавлением 80 У/мл ИЛ-2, и инкубация была продолжена в течение 3-4 дней при 37°C. Данный цикл стимуляций проводили всего три раза. В заключение проводили тетрамерные анализы с флуоресцирующими тетрамерами МНС (полученными, как описывается в работе (Altai et al., 1996)) с антителом CD8-FITC клона SK1 (BD, Heidelberg, Германия) на четырехцветном цитометре FACSCalibur или проточном цитометре LSR II (BD). Пептидспецифические клетки были подсчитаны как процентная доля всех CD8+ Т-клеток. Оценку тетрамерного анализа проводили с помощью программы FCS Express (De Novo Software). Прайминг *in vitro* специфических лимфоцитов тетрамер+CD8+ детектировался установкой подходящего гейта и при сравнении со стимуляциями негативного контроля. Иммуногенность для заданного антигена была детектирована, если было обнаружено, что по крайней мере в одной подлежащей оценке простимулированной *in vitro* лунке одного здорового донора содержалась специфическая CD8+ Т-клеточная линия после стимуляции *in vitro* (т.е. данная лунка содержала по крайней мере 1% специфического тетрамера+среди CD8+ Т-клеток, и процентная доля специфических клеток тетрамера+ была по крайней мере в 10 раз выше среднего значения стимуляций с негативным контролем).

Репрезентативное окрашивание, выявляющее образование Т-клеточных линий, специфических для РТР-002 и РТР-001, представлено на фиг. 3. Результаты обобщены в табл. 3, ниже, вместе с похожим результатом для СН1-001.

Таблица 3

Иммуногенность *in vitro* пептидов по изобретению

Антиген	Иммуногенность обнаружена	Положительн. доноры / проанализированные доноры	Положительн. лунки / проанализированные лунки
РТР-001	Да	6 / 6 (100%)	33 / 96 (34%)
РТР-002	Да	3 / 4 (50%)	9 / 48 (17%)
РТР-003	Да	2 / 4 (50%)	8 / 48 (17%)
РТР-004	Да	2 / 4 (50%)	2 / 48 (4%)
РТР-005	Да	4 / 4 (100%)	24 / 48 (50%)
СН1-001	Да	4 / 4 (100%)	39 / 62 (63%)

Результаты экспериментов по иммуногенности *in vitro*, проведенных изобретателями и заявителем, фирмой "Immatics", показывающие процентную долю доноров и лунок с положительными результатами, также обобщены здесь. Приводимые результаты были получены при стимуляции клеток CD8+ высокоплотными гранулами. Так как различные партии человеческой сыворотки могут сильно влиять на результаты по иммуногенности, то вместе оценивались только те анализы, в которых была использована одна и та же партия сыворотки.

Пример 4. Связывание пептидов, рестриктированных по HLA класса I, с HLA-A*0201.

Целью данного анализа была оценка аффинности пептидов HLA класса I РТР-001, РТР-002, РТР-003, РТР-004 и РТР-005 по отношению к молекуле МНС, закодированной аллелем HLA-A*0201. Аффинности для всех пептидов к HLA-A*0201 были соотносимы с хорошо известным контрольным пептидом HBV-001, константы диссоциации (K_D) находились в диапазоне от 0,02 до 1,6 нМ.

Принципы теста.

Стабильные комплексы HLA/пептид состоят из трех молекул: тяжелой цепи HLA, бета-2 микроглобулина (b2m) и пептидного лиганда. Активность денатурированных рекомбинантных молекул HLA-A*0201 с тяжелой цепью по себе может быть сохранена, делая их функциональными эквивалентами "пустых молекул HLA-A*0201". Если они растворены в водном буфере, содержащем b2m и подходящий пептид, то данные молекулы быстро и эффективно сворачиваются в полной зависимости от пептида. Наличие данных молекул использовалось в анализе, основанном на методике ELISA, для измерения аффинности взаимодействия между пептидом и молекулой HLA класса I (Sylvester-Hvid et al., 2002).

Очищенные рекомбинантные молекулы HLA-A*0201 инкубировали вместе с b2m и ступенчатыми дозами интересующего пептида. Количество новообразовавшихся комплексов HLA/пептид определялось количественным методом ELISA. Константы диссоциации (значения K_D) вычислялись с использованием стандартной калибровочной кривой, записанной с титров комплекса калибровки HLA/пептид.

Результаты представлены на фиг. 4. Более низкое значение K_D отражает более высокую аффинность к HLA-A*0201. Аффинности для всех пептидов к HLA-A*0201 были соотносимы с хорошо известным контрольным пептидом HBV-001, константы диссоциации (K_D) находились в диапазоне от 0,02 до 1,6

Список цитируемой литературы.

- Allison AC 1998. The mode of action of immunological adjuvants; *Dev Biol Stand.*; 92:3-11
- Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, Heyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM (1996). Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274, 94-96.
- Appay V, Speiser DE, Rufer N, Reynard S, Barbey C, Cerottini JC, Leyvraz S, Pinilla C, Romero P (2006). Decreased specific CD8+ T cell cross-reactivity of antigen recognition following vaccination with Melan-A peptide. *Eur. J Immunol.* 36, 1805-1814.
- Ariyama T, Hasegawa K, Inazawa J, Mizuno K, Ogimoto M, Katagiri T, Yakura H (1995). Assignment of the human protein tyrosine phosphatase, receptor-type, zeta (PTPRZ) gene to chromosome band 7q31.3. *Cytogenet. Cell Genet.* 70, 52-54.
- Barnea G, Silvennoinen O, Shaanan B, Honegger AM, Canoll PD, D'Eustachio P, Morse B, Levy JB, Laforgia S, Huebner K, . (1993). Identification of a carbonic anhydrase-like domain in the extracellular region of RPTP gamma defines a new subfamily of receptor tyrosine phosphatases. *Mol. Cell Biol.* 13, 1497-1506.
- Boyton RJ, Lohmann T, Londei M, Kalbacher H, Halder T, Frater AJ, Douek DC, Leslie DG, Flavell RA, Altmann DM (1998). Glutamic acid decarboxylase T lymphocyte responses associated with susceptibility or resistance to type I diabetes: analysis in disease discordant human twins, non-obese diabetic mice and HLA-DQ transgenic mice. *Int. Immunol.* 10, 1765-1776.
- Bruckdorfer T, Marder O, Albericio F. (2004) From production of peptides in milligram amounts for research to multi-ton quantities for drugs of the future *Curr Pharm Biotechnol.* Feb; 5(1):29-43
- Brunsvig PF, Aamdal S, Gjertsen MK, Kvalheim G, Markowski-Grimsrud CJ, Sve I, Dyrhaug M, Trachsel S, Møller M, Eriksen JA, Gaudernack G (2006); Telomerase peptide vaccination: a phase I/II study in patients with non-small cell lung cancer; *Cancer Immunol Immunother.*; 55(12):1553-1564
- Burton EC, Prados MD (2000). Malignant gliomas. *Curr. Treat. Options. Oncol* 1, 459-468.
- CBTRUS. Primary Brain Tumors in the United States, Statistical Report. 2006.
Ref Type: Internet Communication
- Cheever MA, Chen W, Disis ML, Takahashi M, Peace DJ (1993). T-cell immunity to oncogenic proteins including mutated ras and chimeric bcr-abl. *Ann N. Y. Acad. Sci.* 690, 101-112.
- Colombetti S, Basso V, Mueller DI., Mondino A (2006) Prolonged TCR/CD28 engagement drives IL-2-independent T cell clonal expansion through signaling mediated by the mammalian target of rapamycin. *J Immunol.* 176, 2730-2738.
- Cresswell P (1994). Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 259-293.
- Dazzi C, Cariello A, Giannini M, Del DM, Giovanis P, Fiorentini G, Leoni M, Rosti G, Turci D, Tienghi A, Vertogen B, Zumaglini F, De GU, Marangolo M (2000). A sequential chemo-radiotherapeutic treatment for patients with malignant gliomas: a phase II pilot study. *Anticancer Res.* 20, 515-518.
- Dengjel J, Nastke MD, Gouttefangeas C, Gitsioudis G, Schoor O, Altenberend F, Muller M, Kramer B, Missiou A, Sauter M, Hennenlotter J, Wernet D, Stenzl A, Rammensee HG, Klingel K, Stevanovic S (2006). Unexpected Abundance of HLA Class II Presented Peptides in Primary Renal Cell Carcinomas. *Clin Cancer Res.* 12, 4163-4170.
- Dix AR, Brooks WH, Roszman TL, Morford LA (1999). Immune defects observed in patients with primary malignant brain tumors. *J Neuroimmunol.* 100, 216-232.
- Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Sherry R, Restifo NP, Hubicki AM, Robinson MR, Raffeld M, Duray P, Seipp CA, Rogers-Freezer L, Morton KE, Mavroukakis SA, White DE, Rosenberg SA (2002). Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298, 850-854.
- Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, Restifo NP, Royal RE, Kammula U, White DE, Mavroukakis SA, Rogers LJ, Gracia GJ, Jones SA, Mangiameli DP, Pelletier MM, Gea-Banacloche J, Robinson MR, Berman DM, Filie AC, Abati A, Rosenberg SA (2005). Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 23, 2346-2357.
- Dupuis M, Murphy TJ, Higgins D, Ugozzoli M, van Nest G, Ott G, McDonald DM (1998); Dendritic cells internalize vaccine adjuvant after intramuscular injection; *Cell Immunol.*; 186(1):18-27

- Falk K, Rotzschke O, Stevanovic S, Jung G & Rammensee H G. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351, 290-296 (1991)
- Fong L, Brockstedt D, Benike C, Wu L, Engleman EG (2001a). Dendritic cells injected via different routes induce immunity in cancer patients. *J. Immunol.* 166, 4254-4259.
- Fong L, Hou Y, Rivas A, Benike C, Yuen A, Fisher GA, Davis MM, Engleman EG (2001b). Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 8809-8814.
- Gabrilovich DI, Cunningham HT, Carbone DP; IL-12 and mutant P53 peptide-pulsed dendritic cells for the specific immunotherapy of cancer; *J Immunother Emphasis Tumor Immunol.* 1996 (6):414-418
- Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoue F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pages F (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313, 1960-1964.
- Gattinoni L, Powell DJ, Jr., Rosenberg SA, Restifo NP (2006). Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 383-393.
- Gebbink MF, van E, I, Hateboer G, Suijkerbuijk R, Beijersbergen RL, Geurts van KA, Moolenaar WH (1991). Cloning, expression and chromosomal localization of a new putative receptor-like protein tyrosine phosphatase. *FEBS Lett.* 290, 123-130.
- Gnjatic S, Atanackovic D, Jager E, Matsuo M, Selvakumar A, Altorki NK, Maki RG, Dupont B, Ritter G, Chen YT, Knuth A, Old LJ (2003). Survey of naturally occurring CD4+ T cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: correlation with antibody responses. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 8862-8867.
- Hammer J, Gallazzi F, Bono E, Karr RW, Guenot J, Valsasini P, Nagy ZA, Sinigaglia F (1995). Peptide binding specificity of HLA-DR4 molecules: correlation with rheumatoid arthritis association. *J Exp. Med* 181, 1847-1855.
- Hanada K, Yewdell JW, Yang JC (2004). Immune recognition of a human renal cancer antigen through post-translational protein splicing. *Nature* 427, 252-256.
- Harroch S, Furtado GC, Brueck W, Rosenbluth J, Lafaille J, Chao M, Buxbaum JD, Schlessinger J (2002). A critical role for the protein tyrosine phosphatase receptor type Z in functional recovery from demyelinating lesions. *Nat. Genet.* 32, 411-414.
- Heimberger AB, Hussain SF, Aldape K, Sawaya R, Archer GA, Friedman H, Reardon D, Friedman A, Bigner DD, Sampson JH. Tumor-specific peptide vaccination in newly-diagnosed patients with GBM. *Journal of Clinical Oncology, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I Vol 24, No. 18S (June 20 Supplement), 2006: 2529. 6-20-2006.*
- Hill et al (1995) *J. Exp. Med.* 181, 2221-2228
- Jerome et al (1993) *J. Immunol.* 151, 1654-1662
- Jochmus et al (1997) *J. Gen. Virol.* 78, 1689-1695
- Jung G, Ledbetter JA, Muller-Eberhard HJ (1987). Induction of cytotoxicity in resting human T lymphocytes bound to tumor cells by antibody heteroconjugates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 4611-4615.
- Kaplan R, Morse B, Huebner K, Croce C, Howk R, Ravera M, Ricca G, Jaye M, Schlessinger J (1990). Cloning of three human tyrosine phosphatases reveals a multigene family of receptor-linked protein-tyrosine-phosphatases expressed in brain. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 7000-7004.
- Karre and Ljunggren (1985) *J. Exp. Med.* 162, 1745
- Kawakami et al (1992) *J. Immunol.* 148, 638-643
- Kennedy RC, Shearer MH, Watts AM, Bright RK (2003). CD4+ T lymphocytes play a critical role in antibody production and tumor immunity against simian virus 40 large tumor antigen. *Cancer Res.* 63, 1040-1045.
- Kobayashi H, Omiya R, Ruiz M, Huarte E, Sarobe P, Lasarte JJ, Herraiz M, Sangro B, Prieto J, Borrás-Cuesta F, Celis E (2002). Identification of an antigenic epitope for helper T lymphocytes from carcinoembryonic antigen. *Clin Cancer Res.* 8, 3219-3225.
- Arthur M. Krieg, Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation 2006, *Nature Reviews, Drug Discovery*, 5, JUNE, 471-484
- Krueger NX, Streuli M, Saito H (1990). Structural diversity and evolution of human receptor-like protein tyrosine phosphatases. *EMBO J* 9, 3241-3252.
- Lemmel C, Weik S, Eberle U, Dengjel J, Kratt T, Becker HD, Rammensee HG, Stevanovic S (2004). Differential quantitative analysis of MHC ligands by mass spectrometry using stable isotope labeling. *Nat. Biotechnol.* 22, 450-454.
- Levy JB, Canoll PD, Silvennoinen O, Barnea G, Morse B, Honegger AM, Huang JT, Cannizzaro LA, Park SH, Druck T, . (1993). The cloning of a receptor-type protein tyrosine phosphatase expressed in the central nervous system. *J Biol. Chem.* 268, 10573-10581.
- Longenecker et al (1993) *Ann. NY Acad. Sci.* 690,276-291
- Lu et al (1981) *J. Org. Chem.* 46, 3433

- Lu KV, Jong KA, Kim GY, Singh J, Dia EQ, Yoshimoto K, Wang MY, Cloughesy TF, Nelson SF, Mischel PS (2005). Differential induction of glioblastoma migration and growth by two forms of pleiotrophin. *J Biol Chem.* 280, 26953-26964.
- Macdonald DR (2001). Temozolomide for recurrent high-grade glioma. *Semin. Oncol* 28, 3-12.
- Mach B, Steimle V, Martinez-Soria E, Reith W (1996). Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 301-331.
- A Mahdavi and BJ Monk Recent advances in human papillomavirus vaccines *Curr Oncol Rep* 2006, 6, 465-472.
- Malcherek G, Gnau V, Stevanovic S, Rammensee HG, Jung G, Melms A (1994). Analysis of allele-specific contact sites of natural HLA-DR17 ligands. *J Immunol.* 153, 1141-1149.
- Manici S, Sturniolo T, Imro MA, Hammer J, Sinigaglia F, Noppen C, Spagnoli G, Mazzi B, Bellone M, Dellabona P, Protti MP (1999). Melanoma cells present a MAGE-3 epitope to CD4(+) cytotoxic T cells in association with histocompatibility leukocyte antigen DR11. *J Exp. Med* 189, 871-876.
- Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, Royal RE, Topalian SL, Kammula US, Restifo NP, Zheng Z, Nahvi A, de Vries CR, Rogers-Freezer LJ, Mavroukakis SA, Rosenberg SA (2006). Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes. *Science.*
- Mulholland PJ, Fiegler H, Mazzanti C, Gorman P, Sasieni P, Adams J, Jones TA, Babbage JW, Vatcheva R, Ichimura K, East P, Poullikas C, Collins VP, Carter NP, Tomlinson IP, Sheer D (2006). Genomic profiling identifies discrete deletions associated with translocations in glioblastoma multiforme. *Cell Cycle* 5, 783-791.
- Strubin, M., Mach, B. and Long, E.O. (1984) The complete sequence of the mRNA for the HLA-DR-associated invariant chain reveals a polypeptide with an unusual transmembrane polarity *EMBO J.* 3 (4), 869-872.
- Napolitano M, Keime-Guibert F, Monjour A, Lafitte C, Ameri A, Cornu P, Broet P, Delattre JY (1999). Treatment of supratentorial glioblastoma multiforme with radiotherapy and a combination of BCNU and tamoxifen: a phase II study. *J Neurooncol.* 45, 229-235.
- Nieder C, Grosu AL, Molls M (2000). A comparison of treatment results for recurrent malignant gliomas. *Cancer Treat. Rev.* 26, 397-409.
- Novellino L, Castelli C, Parmiani G (2005). A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer Immunol. Immunother.* 54, 187-207.
- Pascolo S. 2006: Vaccination with messenger RNA *Methods Mol Med*, 127; 23-40
- Peoples et al (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92,432-436
- Perez-Pinera P, Garcia-Suarez O, Menendez-Rodriguez P, Mortimer J, Chang Y, Astudillo A, Deuel TF (2007). The receptor protein tyrosine phosphatase (RPTP)beta/zeta is expressed in different subtypes of human breast cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362, 5-10.
- Plebanski et al (1995) *Eur. J. Immunol.* 25, 1783-1787
- Porta et al (1994) *Virology* 202, 449-955
- Prados MD, Levin V (2000). Biology and treatment of malignant glioma. *Semin. Oncol* 27, 1-10.
- Qin Z, Blankenstein T (2000). CD4+ T cell--mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity.* 12, 677-686.
- Qin Z, Schwartzkopff J, Pradera F, Kammertoens T, Seliger B, Pircher H, Blankenstein T (2003). A critical requirement of interferon gamma-mediated angiostasis for tumor rejection by CD8+ T cells. *Cancer Res.* 63, 4095-4100.
- Rammensee HG, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50, 213-219.
- Rammensee,H.G., Bachmann,J., and Stevanovic,S. (1997). *MHC Ligands and Peptide Motifs.* Springer-Verlag, Heidelberg, Germany).
- Rini BI, Weinberg V, Fong L, Conry S, Hershberg RM, Small EJ (2006); Combination immunotherapy with prostatic acid phosphatase pulsed antigen-presenting cells (Provenge) plus bevacizumab in patients with serologic progression of prostate cancer after definitive local therapy; *Cancer.*; 107(1):67-74)
- Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Chang AE, Avis FP, Leitman S, Linehan WM, Robertson CN, Lee RE, Rubin JT, . (1987). A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N. Engl. J. Med.* 316, 889-897.
- Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, Solomon D, Topalian SL, Toy ST, Simon P, Lotze MT, Yang JC, Seipp CA, . (1988). Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N. Engl. J Med* 319, 1676-1680.
- Roth W, Weller M (1999). Chemotherapy and immunotherapy of malignant glioma: molecular mechanisms and clinical perspectives. *Cell Mol. Life Sci.* 56, 481-506.

- Sablitzki A, Ebel H, Muhling J, Dehne MG, Nopens H, Giesselmann H, Hempelmann G (2000). Dysregulation of immune response following neurosurgical operations. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 44, 82-87.
- Saiki et al (1988) *Science* 239,487-491
- Small EJ, Schellhammer PF, Higano CS, Redfern CH, Nemunaitis JJ, Valone FH, Verjee SS, Jones LA, Hershberg RM. (2006); Placebo-controlled phase 3 trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer; *J Clin Oncol.*; 24(19):3089-3094
- Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404, 770-774.
- Seeger, F.H. et al. 1999 The HLA-A*6601 peptide motif: prediction by pocket structure and verification by peptide analysis. *Immunogenetics* 49, 571-576.
- Shedlock DJ, Shen H (2003). Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 300, 337-339.
- Singh-Jasuja H, Emmerich NP, Rammensee HG (2004). The Tubingen approach: identification, selection, and validation of tumor-associated HLA peptides for cancer therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 53, 187-195.
- M. Staehler, A. Stenzl, P. Y. Dietrich, T. Eisen, A. Haferkamp, J. Beck, A. Mayer, S. Walter, H. Singh, J. Frisch, C. G. Stief (2008); An open label study to evaluate the safety and immunogenicity of the peptide based cancer vaccine IMA901, ASCO meeting 2007; Abstract No 3017
- R. Stan, JD Wolchok and AD Cohen DNA vaccines against cancer *Hematol Oncol Clin North Am* 2006, 3; 613-636
- Sun JC, Bevan MJ (2003). Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 300, 339-342.
- Sylvester-Hvid C, Kristensen N, Blicher T, Ferre H, Lauemoller SL, Wolf XA, Lamberth K, Nissen MH, Pedersen LO, Buus S (2002). Establishment of a quantitative ELISA capable of determining peptide - MHC class I interaction. *Tissue Antigens* 59, 251-258.
- Tompkins SM, Rota PA, Moore JC, Jensen PE (1993). A europium fluorimunoassay for measuring binding of antigen to class II MHC glycoproteins. *J Immunol. Methods* 163, 209-216.
- van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De PE, Van den EB, Knuth A, Boon T (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254, 1643-1647.
- Vigneron N, Stroobant V, Chapiro J, Ooms A, Degiovanni G, Morel S, van der BP, Boon T, Van Den Eynde BJ (2004). An antigenic peptide produced by peptide splicing in the proteasome. *Science* 304, 587-590.
- Vogt AB, Kropshofer H, Kalbacher H, Kalbus M, Rammensee HG, Coligan JE, Martin R (1994). Ligand motifs of HLA-DRB5*0101 and DRB1*1501 molecules delineated from self-peptides. *J Immunol.* 153, 1665-1673.
- Walter S, Herrgen L, Schoor O, Jung G, Wernet D, Buhning HJ, Rammensee HG, Stevanovic S (2003). Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres. *J. Immunol.* 171, 4974-4978.
- Wang JC, Livingstone AM (2003). Cutting edge: CD4+ T cell help can be essential for primary CD8+ T cell responses in vivo. *J Immunol.* 171, 6339-6343.
- Wang V, Davis DA, Haque M, Huang LE, Yarchoan R (2005). Differential gene up-regulation by hypoxia-inducible factor-1alpha and hypoxia-inducible factor-2alpha in HEK293T cells. *Cancer Res.* 65, 3299-3306.
- Weinschenk T, Gouttefangeas C, Schirle M, Obermayr F, Walter S, Schoor O, Kurek R, Loeser W, Bichler KH, Wernet D, Stevanovic S, Rammensee HG (2002). Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res.* 62, 5818-5827.
- Wu CW, !Lost Data, Li AF, Chi CW, Lin WC (2006). Protein tyrosine-phosphatase expression profiling in gastric cancer tissues. *Cancer Lett.* 242, 95-103.
- Yee C, Thompson JA, Byrd D, Riddell SR, Roche P, Celis E, Greenberg PD (2002). Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 16168-16173.
- Zaremba S, Barzaga E, Zhu M, Soares N, Tsang KY, Schlom J (1997). Identification of an enhancer agonist cytotoxic T lymphocyte peptide from human carcinoembryonic antigen. *Cancer Res.* 57, 4570-4577.
- Zeh HJ, III, Perry-Lalley D, Dudley ME, Rosenberg SA, Yang JC (1999). High avidity CTLs for two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo antitumor efficacy. *J Immunol.* 162, 989-994.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептид длиной 9-30 аминокислотных остатков, включающий непрерывную последовательность SEQ ID № 5, который способен связываться с молекулой главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) класса I, индуцировать цитотоксические CD8 Т-лимфоциты и стимулировать антиопухольные иммунные ответы.

2. Пептид по п.1, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID № 5.

3. Пептид по любому из пп.1 и 2, включающий непептидные связи, выбранные из $-\text{CH}_2\text{-NH}$, $-\text{CH}_2\text{S-}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$, $-\text{CH}=\text{CH-}$, $-\text{COCH}_2\text{-}$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{-}$ и $-\text{CH}_2\text{SO-}$.

4. Пептид по любому из пп.1-3, слитый с N-терминальными аминокислотами антигенассоциированной инвариантной цепи (Ii) HLA-DR.

5. Способ получения активированных цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) *in vitro*, включающий обеспечение контактирования *in vitro* ЦТЛ с нагруженными антигеном молекулами МНС класса I человека, экспрессированными на поверхности подходящей антигенпрезентирующей клетки или искусственной конструкции, имитирующей антигенпрезентирующую клетку, в течение периода времени, достаточного для активации указанных ЦТЛ антигенспецифическим образом, где указанный антиген является пептидом по любому из пп.1-3.

6. Активированный ЦТЛ, полученный с помощью способа по п.5, который селективно распознает клетку, aberrantly экспрессирующую пептид по любому из пп.1 и 2.

7. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид по любому из пп.1-4, или вектор, способный экспрессировать указанную нуклеиновую кислоту.

8. Способ получения пептида по любому из пп.1-4, включающий культивирование клетки-хозяина по п.7 и выделение пептида из клетки-хозяина или ее культуральной среды.

9. Применение пептида по любому из пп.1-4 для изготовления лекарственного средства для лечения рака, выбранного из астроцитомы, пилоидной астроцитомы, дисэмбриопластической нейроэпителиальной опухоли, олигодендроглиомы, эпендимомы, мультиформной глиобластомы, смешанной глиомы, олигоастроцитомы, медуллобластомы, ретинобластомы, нейробластомы, герминомы, тератомы, ганглиоглиомы, ганглиоцитомы, центральной ганглиоцитомы, примитивной нейроэктодермальной опухоли, опухоли паренхимы шишковидной железы, опухоли, развивающейся из эпендимных клеток, опухоли хориоидного сплетения, нейроэпителиальной опухоли неопределенного происхождения или глиобластомы, рака легких или аденосквамозной карциномы.

10. Применение клетки по п.7 для изготовления лекарственного средства для лечения рака, выбранного из астроцитомы, пилоидной астроцитомы, дисэмбриопластической нейроэпителиальной опухоли, олигодендроглиомы, эпендимомы, мультиформной глиобластомы, смешанной глиомы, олигоастроцитомы, медуллобластомы, ретинобластомы, нейробластомы, герминомы, тератомы, ганглиоглиомы, ганглиоцитомы, центральной ганглиоцитомы, примитивной нейроэктодермальной опухоли, опухоли паренхимы шишковидной железы, опухоли, развивающейся из эпендимных клеток, опухоли хориоидного сплетения, нейроэпителиальной опухоли неопределенного происхождения или глиобластомы, рака легких или аденосквамозной карциномы.

11. Применение активированного ЦТЛ по п.6 для изготовления лекарственного средства для лечения рака, выбранного из астроцитомы, пилоидной астроцитомы, дисэмбриопластической нейроэпителиальной опухоли, олигодендроглиомы, эпендимомы, мультиформной глиобластомы, смешанной глиомы, олигоастроцитомы, медуллобластомы, ретинобластомы, нейробластомы, герминомы, тератомы, ганглиоглиомы, ганглиоцитомы, центральной ганглиоцитомы, примитивной нейроэктодермальной опухоли, опухоли паренхимы шишковидной железы, опухоли, развивающейся из эпендимных клеток, опухоли хориоидного сплетения, нейроэпителиальной опухоли неопределенного происхождения или глиобластомы, рака легких или аденосквамозной карциномы.

12. Применение по любому из пп.9-11, где лекарственное средство представляет собой вакцину.

13. Применение пептида по п.1 для получения специфических антител к комплексам МНС/пептид.

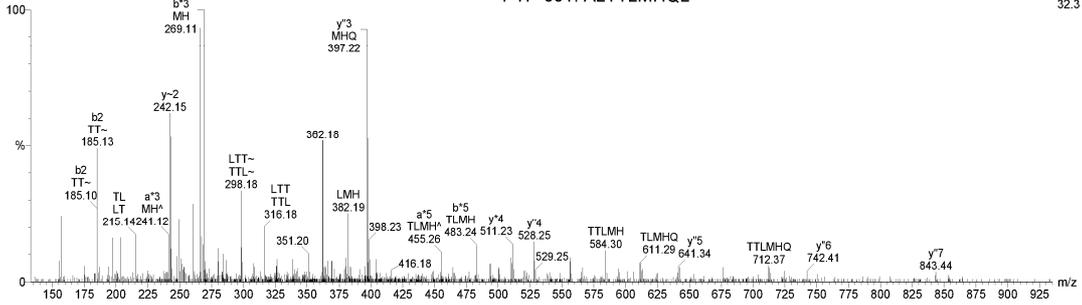
034800

образец 435 GB1006T 50/200 (BB7.2)

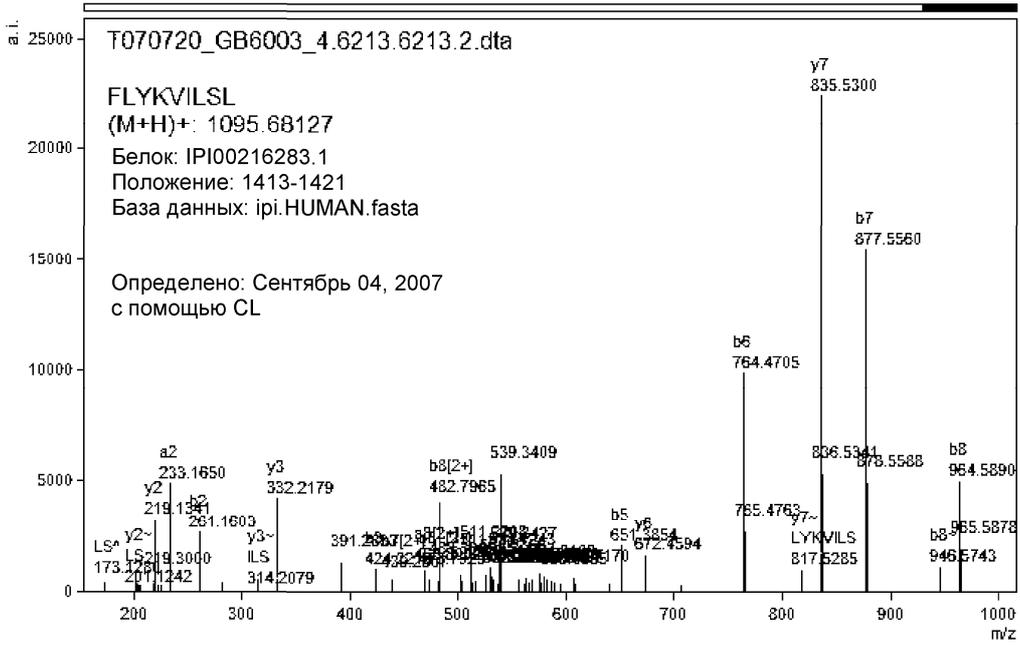
T060622_GB1006_2_272 (79.410) Sm (SG, 2x3.00); Cm (271:272)

PTP-001: ALTTLMHQL

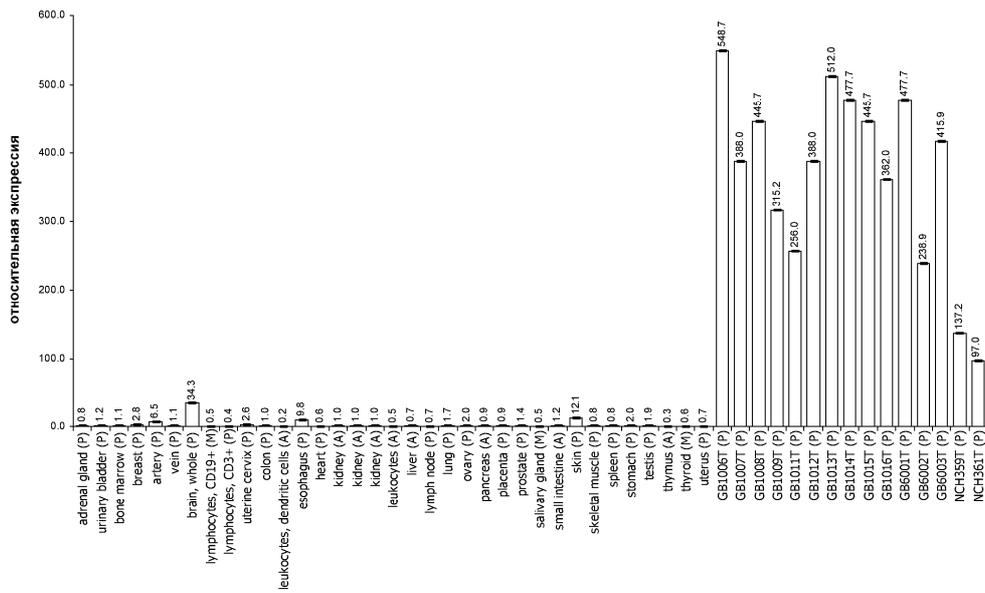
2: TOF MSMS 514.28ES+
32.3



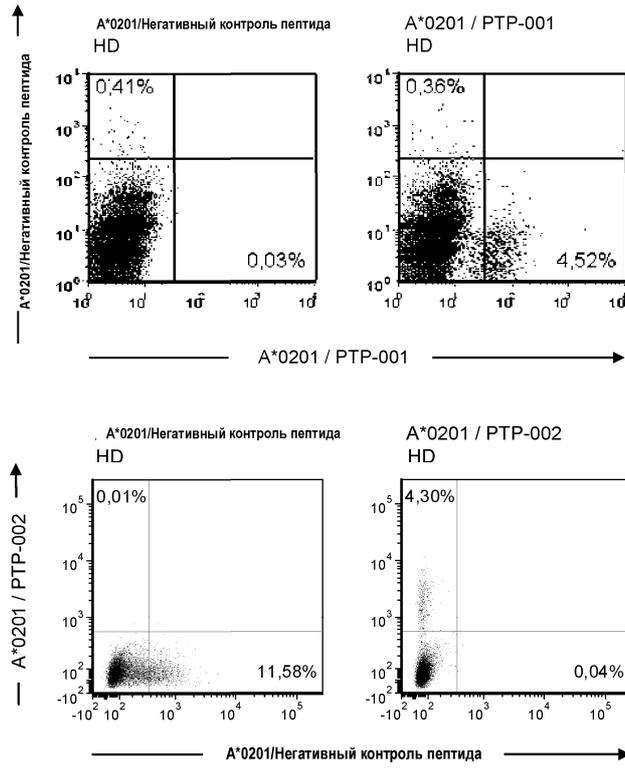
Фиг. 1a. PTP-001 (GB1006)



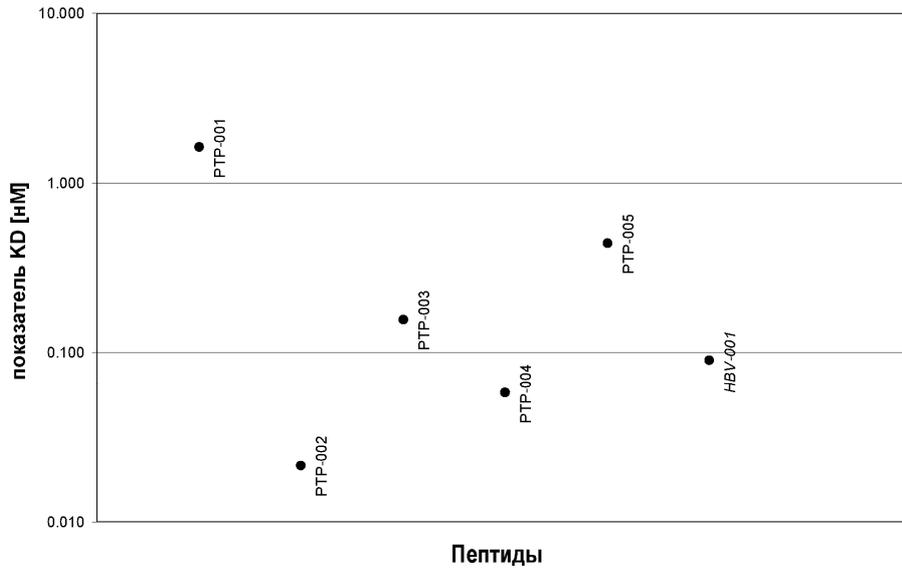
Фиг. 1b. PTP-002 (GB6003)



Фиг. 2. Профиль экспрессии мРНК PTPRZ1



Фиг. 3



Фиг. 4

