

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992417** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.02.20

(22) Дата подачи заявки
2018.04.10

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

**(54) ПЕПТИДЫ И ИХ КОМБИНАЦИИ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ИММУНОТЕРАПИИ
РАКОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

(31) 10 2017 107 697.2; 62/483,702

(32) 2017.04.10

(33) DE; US

(86) PCT/EP2018/059109

(87) WO 2018/189148 2018.10.18

(71) Заявитель:
**ИММАТИКС БАЙОТЕКНОЛОДЖИЗ
ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:

**Ди Марко Морено, Хаен Себастьян,
Ковапевски Дэниэл, Пёффпер Маркус,
Непье Анника, Раммензее Ганс-
Георг, Стеванович Стефан, Траутвайн
Нико, Вапц Джулиана Сара (DE)**

(74) Представитель:

**Глухарёва А.О., Угрюмов В.М.,
Гизатуллин Ш.Ф. (RU)**

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

A1

201992417

201992417

A1

Пептиды и их комбинации для применения в иммунотерапии раковых заболеваний

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

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

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

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

Согласно оценкам, на 2012 г. приходится 14,1 миллиона новых случаев заболевания раком, 32,6 миллиона пациентов, страдающих раковыми заболеваниями (в течение 5 лет после постановки диагноза), и 8,2 миллиона случаев летального исхода от рака в мире (Ferlay et al., 2013; Bray et al., 2013).

Приблизительная частота заболеваемости различными видами рака (взрослая популяция, оба пола) во всем мире в 2012 г. составила (Ferlay et al., 2013; Bray et al., 2013): раком головного мозга и нервной системы: 256213, колоректальным раком: 1360602, раком почки: 337860, раком печени: 782451 и раком желудка: 951594 случаев.

Приблизительная частота заболеваемости различными видами рака (взрослая популяция, оба пола) в США, ЕС-28, Китае и Японии в 2012 г. составила (Ferlay et al., 2013; Bray et al., 2013): раком головного мозга и нервной системы: 135884, колоректальным раком: 845797, раком почки: 226733, раком печени: 513172 и раком желудка: 615641 случай.

Приблизительный уровень смертности от различных видов рака (взрослая популяция, оба пола) во всем мире в 2012 г. составил (Ferlay et al., 2013; Bray et al., 2013): от рака головного мозга и нервной системы: 189382, колоректального рака: 693933, рака почки: 143406, рака печени: 745533 и рака желудка: 723073 случая.

Приблизительный уровень смертности от различных видов рака (взрослая популяция, оба пола) в США, ЕС-28, Китае и Японии в 2012 г. составил (Ferlay et al., 2013; Bray et al., 2013): от рака головного мозга и нервной системы: 100865, колоректального рака: 396066, рака почки: 83741, рака печени: 488485 и рака желудка: 447735 случаев.

Среди групп рака головного мозга предложенное изобретение специфически сфокусировано на глиобластоме (ГБМ). Глиобластома является наиболее

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

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

Удаление опухоли является необходимым шагом в лечении КРК. Анатомические условия карцином прямой кишки отличаются от других видов КРК, поскольку прямая кишка расположена в тазу и опухоль может быть сложно доступной. Хорошо дифференцированные малые опухоли прямой кишки (стадия T1) требуют эксцизии, но не последующего лечения химиотерапией. Пациенты с опухолями прямой кишки более поздних стадий T до полного (тотального) удаления мезоректума (TME) и адъювантной химиотерапии получают лечение комбинацией неoadъювантной химиотерапии и лучевой химиотерапии на основе фторпиримидина. Для химиотерапии используются препараты капецитабин или 5-фторурацил (5-FU). Для комбинированной химиотерапии рекомендуется использование коктейля препаратов, содержащего 5-FU, лейковорин и оксалиплатин (FOLFOX) (Stintzing, 2014; Berman et al., 2015b).

Лечение карцином толстой кишки включает радикальную гемиколэктомию и резекцию лимфатических узлов. Ранние стадии (стадия I по UICC) не требуют дополнительного лечения. Пациенты с опухолями стадии II по UICC получают лечение 5-FU или капецитабином. Лечение пациентов на стадии III по UICC

включает комбинации препаратов FOLFOX и XELOX (капецитабин плюс оксалиплатин) (Berman et al., 2015a; Stintzing, 2014).

Метастатические, нерезектабельные КРК лечат комбинациями химиотерапевтических препаратов (коктейлями), такими как FOLFIRI (5-FU, лейковорин, иринотекан), FOLFOX, FOLFOXIRI (5-FU, иринотекан, оксалиплатин), FOLFOX/капецитабин, FOLFOX/ оксалиплатин, FOLFIRI/капецитабин и иринотекан или UFT (5-FU, тегафур-урацил) (Stintzing, 2014).

Кроме химиотерапевтических препаратов пациентам с заболеванием на поздних стадиях вводят несколько моноклональных антител, мишенями которых являются рецептор эпидермального фактора роста (EGFR, цетуксимаб, панитумумаб) или сосудистый эндотелиальный фактор роста-A (VEGF-A, бевацизумаб). Для терапии второй и более поздних линий могут использоваться ингибитор VEGF афлиберцепт, ингибитор тирозинкиназы регорафениб и ингибитор тимидилатсинтазы TAS-102 и ингибитор дУТФазы TAS-114 (Stintzing, 2014; Wilson et al., 2014).

В последних клинических исследованиях в качестве варианта лечения КРК анализируется активная иммунотерапия. Ее стратегии включают вакцинацию пептидами из опухолиассоциированных антигенов (ТАА), цельными опухолевыми клетками, вакцинами на основе дендритных клеток (ДК) и вирусными векторами (Koido et al., 2013).

Пептидные вакцины до сих пор были направлены на раковоэмбриональный антиген (CEA), муцин 1, EGFR, антиген плоскоклеточной карциномы, распознаваемый Т-клетками 3 (SART3), человеческий хориогонадотропин-бета (бета-ХГЧ), антиген опухоли Уильмса 1 (WT1), сурвивин-2B, MAGE3, p53, белок с доменом *ring finger* 43 и транслоказу внешней митохондриальной мембраны 34 (ТОММ34) или имеющий мутации белок KRAS. В нескольких клинических исследованиях фазы I и II у пациентов наблюдались антиген-специфические ответы ЦТЛ или выработка

антител. В отличие от иммунологических ответов многие пациенты не получают пользы от пептидных вакцин на клиническом уровне (Koido et al., 2013; Miyagi et al., 2001; Moulton et al., 2002; Okuno et al., 2011).

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

Вакцины на основе цельных опухолевых клеток состоят из аутологичных опухолевых клеток, модифицированных таким образом, чтобы секретировать ГМ-КСФ. Модификация осуществляется под воздействием излучения или с помощью инфицированных вирусом облученных клеток. Большинство пациентов не получило клинической пользы в нескольких клинических исследованиях II/III фазы (Koido et al., 2013).

Вирус коровьей оспы или птичий вирус оспы с дефектом репликации, кодирующий СЕА (раковозмбриональный антиген), а также B7.1, ICAM-1 и LFA-3 использовали в качестве носителей в клинических исследованиях I фазы вакцин на основе вирусных векторов. В другом исследовании использовали нереплицируемый вирус оспы канареек, кодирующий СЕА, и B7.1. Кроме индукции СЕА-специфических Т-клеточных ответов, 40% пациентов продемонстрировали объективные клинические ответы (Horig et al., 2000; Kaufman et al., 2008).

Рак желудка - стенки желудка состоят из трех слоев тканей: слизистого (глубинного) слоя, мышечного (среднего) слоя и серозного (наружного) слоя. Рак желудка (РЖ) развивается в клетках, выстилающих слизистую оболочку, и распространяется во время роста во внешние слои. Применяются четыре стандартных способа лечения. Лечение рака желудка может включать эндоскопическую или хирургическую

резекцию, химиотерапию, лучевую терапию или химиолучевую терапию. Операция является основным и единственным способом радикального лечения рака желудка. Поскольку на ранних стадиях рак желудка протекает в основном бессимптомно, диагноз заболевания ставят обычно на поздних стадиях. Для лечения метастатического рака желудка до сих пор нет глобально принятой стандартной схемы лечения комбинированной химиотерапией. Тем не менее, комбинация 5-FU и аналога платины является до сих пор наиболее широко используемой стандартной схемой во всем мире, хотя 5-FU может заменяться капецитабином или иринотеканом и цисплатин может заменяться оксалиплатином. Кроме того, может применяться терапия на основе комбинации трех препаратов, куда входят цисплатин, 5-FU и доцетаксел, или, в случае опухолей, избыточно экспрессирующих HER-2, цисплатин, 5-FU и трастузумаб (Leitlinie Magenkarzinom, 2012).

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

Глиобластома - существует крайне мало вариантов лечения глиобластомы (IV степени злокачественности по классификации ВОЗ). Согласно руководству, опубликованному Германским обществом неврологии, стандартная терапия для молодых пациентов включает резекцию или биопсию опухоли, фокальную лучевую

терапию и химиотерапию на основе темозоломида. Альтернативные схемы химиотерапевтического лечения основаны на CCNU/ломустине или прокарбазине в комбинации с CCNU и винкристином (PCV). Для пациентов пожилого возраста не рекомендуется резекция или биопсия опухоли. Такие пациенты получают химиотерапию или лучевую терапию в зависимости от статуса метилирования промотора Об-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза-(MGMT). Отрицательный статус метилирования является показанием для фокальной лучевой терапии, тогда как положительный статус метилирования является показанием для лечения темозоломидом с фокальной лучевой терапией или без нее. Лечение рецидивов опять же включает резекцию, а также химиотерапию и лучевую терапию. В США, Канаде и Швейцарии применение бевацизумаба (антитело к VEGF) также одобрено для лечения рецидивов (Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, 2014).

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

Как было продемонстрировано, антитела к ингибиторным Т-клеточным рецепторам или их лигандам эффективно усиливают опосредованные Т-клетками иммунные ответы против опухоли при различных видах рака, включая меланому и рак мочевого пузыря. Воздействие антител, активирующих Т-клетки, таких как ипилимумаб и ниволумаб, проходит оценку в клинических исследованиях глиобластомы, однако предварительные данные указывают на побочные эффекты, связанные с аутоиммунными реакциями.

Сейчас проводятся исследования различных стратегий вакцинации для пациентов, больных глиобластомой, в том числе вакцин на основе пептидов, белков теплового шока, аутологичных вакцин на основе опухолевых клеток, дендритных клеток и вирусных белков. Чтобы вызвать противоопухолевый иммунный ответ у пациентов с глиобластомой в данных подходах используются пептиды, полученные из

глиобластома-ассоциированных белков, таких как рецептор эпидермального фактора роста вариант III (EGFRvIII) или белков теплового шока или дендритных клеток, обработанных лизатом аутологических опухолевых клеток или компонентами цитомегаловируса. Несколько из этих исследований обнаружили хорошие профили безопасности и переносимости, а также показали многообещающие результаты по эффективности.

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

Рак печени - лечение пациентов с заболеванием зависит от стадии опухоли в момент постановки диагноза и общего состояния печени. Если возможно, то с помощью хирургической операции удаляют части печени (частичная гепатэктомия) или весь орган целиком (резекция печени). Особенно подходящими для получения трансплантата печени являются пациенты с малыми или полностью резектабельными опухолями.

Если хирургическая операция не является возможным вариантом лечения, то в распоряжении имеются различные другие виды терапии. В целях абляции опухоли в печень вводят зонд, и опухоль разрушается с помощью радиоволн или микроволнового воздействия или криотерапии. При процедуре эмболизации с помощью механических или химических средств блокируют поступление крови в опухоль. Высокоинтенсивные радиоволны могут использоваться для разрушения опухоли в рамках лучевой терапии.

Химиотерапия против ГМК включает комбинации из доксорубицина, 5-фторурацила и цисплатина для системной терапии и доксорубицина, флоксуридина и митомицина С для инфузии в печеночную артерию. Однако большинство ГМК

обладают высокой резистентностью к химиотерапевтическим средствам (Enguita-German and Fortes, 2014).

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

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

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

Почечно-клеточная карцинома - первичное лечение наиболее часто представляет собой частичное или полное удаление пораженной(ых) почки(почек) и остается

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

Эверолимус и акситиниб рекомендуются в качестве терапии второй линии для пациентов, которые не получили пользы от VEGF-таргетной терапии при использовании ИТК в соответствии с общепринятыми рекомендациями.

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

антигена 5T4, с поксвирусным вектором) в дополнение к стандартной терапии первой линии. Медиана выживаемости не была достигнута ни в одной из групп с 399 пациентами (54%), продолжающих исследование, тем не менее анализ данных подтверждает полученные ранее клинические результаты, демонстрируя, что вакцина TroVax является иммунологически активной, и что существует корреляция между интенсивностью ответа на 5T4-специфические антитела и улучшением выживаемости. Далее проводятся несколько исследований пептидных вакцин с применением эпитопов, избыточно экспрессируемых клетками ПКК.

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

Принимая во внимание серьезные побочные эффекты и высокие расходы, связанные с лечением рака, существует необходимость идентифицировать факторы, которые могут быть использованы для лечения рака вообще и колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы и почечно-клеточной карциномы в частности. Также существует необходимость идентифицировать факторы, представляющие собой биомаркеры рака в целом и колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы и почечно-клеточной карциномы в частности, что позволит лучше ставить диагноз, составлять прогноз и предсказывать успех лечения.

Иммунотерапия рака представляет собой вариант специфического воздействия на раковые клетки при снижении до минимума побочных эффектов. В иммунотерапии рака находит применение существование опухолеассоциированных антигенов.

Актуальная классификация опухолеассоциированных антигенов (ТАА) включает следующие основные группы:

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

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

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

г) Опухолеспецифические антигены: данные уникальные ТАА образуются в результате мутаций нормальных генов (таких как β -катенин, CDK4 и т. д.).

Некоторые из этих молекулярных изменений ассоциированы с неопластической трансформацией и/или прогрессией. Опухолеспецифические антигены, в основном, способны индуцировать сильные иммунные ответы, не заключая в себе риска аутоиммунных реакций по отношению к нормальным тканям. С другой стороны, данные ТАА в большинстве случаев подходят только для определенной опухоли, на которой они были идентифицированы, и обычно не являются общими для многих отдельных опухолей. Опухолевая специфичность (или ассоциация) пептида может также возникнуть, если пептид образован из опухолевого (опухоль-ассоциированного) экзона в случае белков с опухоль-специфическими (-ассоциированными) изоформами.

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

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

Мишенями иммунотерапии, основанной на Т-клетках, являются пептидные эпитопы, полученные из опухолеассоциированных или опухолеспецифических белков, которые презентуются молекулами главного комплекса гистосовместимости человека (МНС). Антигены, которые распознаются опухолеспецифическими Т-лимфоцитами, то есть их эпитопами, могут быть молекулами, образованными из любого класса белков, таких как ферменты,

рецепторы, факторы транскрипции и т. д., которые экспрессируются и, по сравнению с не измененными клетками того же происхождения, обычно имеют повышенный уровень в клетках соответствующей опухоли.

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

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

Комплексы пептида и молекул МНС I класса распознаются CD8-положительными Т-клетками, несущими подходящий Т-клеточный рецептор (ТКР), тогда как комплексы пептида и молекул МНС II класса распознаются CD4-положительными хелперными Т-клетками, несущими подходящий ТКР. Хорошо известно, что ТКР, пептид и МНС встречаются в стехиометрическом соотношении 1:1:1.

CD4-положительные хелперные Т-клетки играют важную роль в индуцировании и поддержании эффективных ответов CD8-положительных цитотоксических Т-

клеток. Идентификация CD4-положительных Т-клеточных эпитопов, образованных из опухолиассоциированных антигенов (ТАА), имеет огромное значение для разработки фармацевтических препаратов для инициации противоопухолевых иммунных ответов (Gnjatic et al., 2003). В месте локализации опухоли Т-хелперные клетки поддерживают благоприятное для ЦТЛ цитокиновое окружение (Mortara et al., 2006) и привлекают эффекторные клетки, к примеру, ЦТЛ, естественные киллерные клетки (NK), макрофаги, гранулоциты (Hwang et al., 2007).

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

Более длинные (удлиненные) пептиды по изобретению могут выступать в качестве активных эпитопов к молекулам МНС II класса.

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

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

Так как конститутивная экспрессия молекул HLA II класса обычно ограничена иммунными клетками, то выделение пептидов II класса непосредственно из первичных опухолей ранее считалось невозможным. Тем не менее, Dengjel с соавторами удалось идентифицировать ряд эпитопов MHC II класса непосредственно из опухолей (WO 2007/028574, EP 1 760 088 B1).

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

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

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

Для того чтобы белки были распознаны Т-лимфоцитами в качестве опухолеспецифических или –ассоциированных антигенов, и чтобы они могли использоваться в терапии, должны выполняться особые предварительные требования. Антиген должен экспрессироваться преимущественно опухолевыми клетками и не экспрессироваться или экспрессироваться в сравнительно малом количестве здоровыми тканями. В предпочтительном варианте осуществления пептид должен избыточно презентироваться опухолевыми клетками по сравнению с нормальными здоровыми тканями. Кроме того, желательно, чтобы соответствующий антиген не только присутствовал в каком-либо виде опухоли, но и также имел высокую концентрацию (т. е. несколько копий соответствующего пептида на клетку). Опухолеспецифические и опухолеассоциированные антигены часто образованы из белков, напрямую задействованных в трансформации нормальной клетки в опухолевую, в связи с их функцией, например, при контроле клеточного цикла или подавлении апоптоза. Кроме того, нисходящие мишени белков, напрямую являющихся причиной трансформации, могут быть представлены в повышенном количестве и, таким образом, быть косвенно опухолеассоциированными. Такие косвенно опухолеассоциированные антигены могут также быть мишенями вакцинационного подхода (Singh-Jasuja et al., 2004). Необходимо, чтобы эпитопы присутствовали в аминокислотной последовательности антигена, чтобы гарантировать, что такой пептид («иммуногенный пептид»), образованный из опухолеассоциированного антигена, ведет к Т-клеточному ответу *in vitro* или *in vivo*.

В сущности, любой пептид, способный связываться с молекулой МНС может выполнять функцию Т-клеточного эпитопа. Предварительным условием для

индукции Т-клеточного ответа *in vitro* или *in vivo* является присутствие Т-клетки с соответствующим ТКР и отсутствие иммунологической толерантности к данному конкретному эпитопу.

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

В случае нацеливания на комплексы пептида с МНС специфических ТКР (например, растворимых ТКР) и антител или других связывающихся с ними молекул (каркасов) в соответствии с изобретением иммуногенность лежащих в основе

пептидов является второстепенной. В таких случаях презентация является определяющим фактором.

В первом аспекте настоящее изобретение относится к пептиду, включающему аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 268, или его варианту, который по меньшей мере на 77%, предпочтительно, по меньшей мере на 88% гомологичен (предпочтительно, по меньшей мере на 77% или по меньшей мере на 88% идентичен) последовательности с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 268, где указанный вариант связывается с МНС и/или индуцирует Т-клеточную перекрестную реакцию с указанным пептидом, или его фармацевтически приемлемой соли, где указанный пептид не является базовым полипептидом полной длины.

Настоящее изобретение относится далее к пептиду по настоящему изобретению, включающему последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID No. 1 по SEQ ID NO 268, или его варианту, который по меньшей мере на 77%, предпочтительно, по меньшей мере на 88% гомологичен (предпочтительно, по меньшей мере на 77% или по меньшей мере на 88% идентичен) последовательности с SEQ ID No. 1 по SEQ ID NO 268, где указанный пептид или его вариант обладает общей длиной, составляющей 8–100, предпочтительно 8–30 и, наиболее предпочтительно, 8–14 аминокислот.

В последующих таблицах представлены пептиды в соответствии с настоящим изобретением, соответствующие им SEQ ID NO. и потенциальные исходные (лежащие в основе) гены для данных пептидов. В Таблице 1 пептиды с последовательностями с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 37 связываются с HLA-A*01, пептиды с последовательностями с SEQ ID No. 38 по SEQ ID No. 61 связываются с HLA-A*02, пептиды с последовательностями с SEQ ID No. 62 по SEQ ID No. 112 связываются с HLA-A*03, пептиды с последовательностями с SEQ ID No. 113 по SEQ ID No. 142 связываются с HLA-A*24, пептиды с последовательностями с SEQ ID No. 143 по SEQ ID No. 175 связываются с HLA-B*07, пептиды с

последовательностями с SEQ ID No. 176 по SEQ ID No. 194 связываются с HLA-B*08, пептиды с последовательностями с SEQ ID No. 195 по SEQ ID No. 241 связываются с HLA-B*44. Пептиды из Таблицы 2 были раскрыты ранее в виде обширных списков в качестве результатов скринингов с высокой пропускной способностью с высокой долей ошибок или были вычислены с помощью алгоритмов, однако ранее ни в коей мере не были ассоциированы с раковыми заболеваниями. В Таблице 2 пептиды с последовательностями с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 248 связываются с HLA-A*01, пептиды с последовательностями с SEQ ID No. 249 по SEQ ID No. 251 связываются с HLA-A*02, пептиды с последовательностями с SEQ ID No. 252 по SEQ ID No. 254 связываются с HLA-A*03, пептиды с последовательностями с SEQ ID No. 255 по SEQ ID No. 259 связываются с HLA-B*07, пептиды с последовательностями с SEQ ID No. 260 по SEQ ID No. 266 связываются с HLA-B*44. Пептиды из Таблицы 3 являются дополнительными пептидами, которые могут быть полезны в комбинации с другими пептидами по изобретению. В Таблице 3 пептиды с последовательностями с SEQ ID No. 267 связываются с HLA-A*02, пептиды с последовательностями с SEQ ID No. 268 связываются с HLA-A*24.

Таблица 1: Пептиды в соответствии с настоящим изобретением.

Seq ID No	Последовательность	Официальный(ые) символ(ы) гена	Аллотип HLA
1	RSDPVTLDV	CEACAM5	A*01
2	LPSPTDSNFY	EGFR	A*01
3	ASSTDSASY	APOB	A*01
4	NSDLKYNAL	APOB	A*01
5	SILGSDVRVPSY	APOB	A*01
6	VLDLSTNVY	APOB	A*01
7	LITGDPKAAAYDY	COL11A1	A*01/A*03
8	TPVTEFSLNTY	COL6A3	A*01
9	FITAQNHGY	CPS1	A*01
10	ITAQNHGY	CPS1	A*01
11	LSAGSGPGQY	CPT2	A*01
12	ITFGERFEY	CYP2J2	A*01
13	GSTMVEHNY	DCBLD2	A*01/A*03
14	YTERDGSAMVY	DCLK2	A*01
15	LTDYLKNTY	DPP4	A*01
16	LSLIDRLVLY	EGLN3	A*01
17	YTDKLQHY	EPHB2	A*01
18	EVSNGKWLLY	ITGA3	A*01/A*03
19	VSNGKWLLY	ITGA3	A*01/A*03
20	STDEITTRY	KLB	A*01
21	STDIGALMY	MMP1	A*01
22	TLEQVQLYY	MYO7B	A*01
23	TASEDVFQY	NOX1	A*01
24	YTHHLFIFY	NOX1	A*01
25	LMKEVMEHY	PLOD2	A*01/B*15
26	EVLDSHIHAY	PTPRZ1	A*01
27	LDSHIHAY	PTPRZ1	A*01
28	LTDYINANY	PTPRZ1	A*01
29	SVTDLEMPHY	PTPRZ1	A*01/B*18
30	VLDSHIHAY	PTPRZ1	A*01
31	VTDLEMPHY	PTPRZ1	A*01
32	ATVGYFIFY	RNF128	A*01
33	FADKIHLAY	RNF128	A*01
34	ITDFNNIRY	RP11-1220K2.2	A*01
35	FASDLLHLY	SLC16A11	A*01
36	YAAYIIHAY	TLR3	A*01/A*29
37	LTDSFPLKV	TTPA	A*01
38	VMLNSNVLL	AC010879.1, NLGN4X, NLGN4Y	A*02
39	YLLPSVLL	AGPAT5	A*02
40	KIDDIWNLEV	APOB	A*02

41	SLQDTKITL	APOB	A*02
42	KMMALVAEL	CCDC146	A*02
43	GLMTIVTSL	CCL24	A*02
44	SQTGFVVLV	CHI3L1	A*02
45	KLLDEVTYL	CYP2J2	A*02
46	VLITGLPLI	CYP2J2	A*02
47	YQDSWFQQL	CYP2J2	A*02
48	NLTFIILI	F13B	A*02
49	NLASRPYSL	F5	A*02
50	ELMPRVYTL	FAT1	A*02
51	ALAAELNQL	GFAP	A*02
52	YVSSGEMMV	GFAP	A*02
53	LLMTSLTES	LRRN1	A*02
54	YLPPTDPRMSV	MMP16	A*02
55	RLWQIQHHL	MTCP1	A*02
56	FLNQIYTQL	MUC5AC	A*02
57	GLTGVIMTI	NOX1	A*02
58	MLCLLLTL	PAEP	A*02
59	KLHEIYIQA	PCDHGC3	A*02
60	GLPDFVKEL	RP11-1220K2.2	A*02
61	RLFGLFLNNV	TLR3	A*02
62	GSYSALLAKK	ABCC2	A*03/A*11
63	KVLGPNGLLK	ABCC2	A*03
64	STTKLYLAK	ABCC2	A*03/A*11
65	VLGPNGLLK	ABCC2	A*03/A*68
66	ATYEGIQKK	ALDH1L1, ALDH1L2	A*03/A*11
67	ATALSLSNK	APOB	A*03
68	ATAYGSTVSK	APOB	A*03/A*11
69	ATAYGSTVSKR	APOB	A*03
70	ATWSASLKNK	APOB	A*03
71	KLGNPNVSK	APOB	A*03
72	KQVFPGLNY	APOB	A*03
73	KSFDRHFEL	APOB	A*03/A*11
74	QLYSKFLK	APOB	A*03
75	QVPTFTIPK	APOB	A*03
76	SAFGYVFPK	APOB	A*03/A*11
77	SSASLAHMK	APOB	A*03/A*68
78	STKSTSPPK	APOB	A*03
79	STNNEGNLK	APOB	A*03/A*11
80	STSHHLVSR	APOB	A*03/A*68
81	SVKLQGTSK	APOB	A*03/A*68

82	TAYGSTVSK	APOB	A*03
83	TAYGSTVSKR	APOB	A*03/A*68
84	TVASLHTEK	APOB	A*03/A*68
85	KMAAWPFSR	C4BPA	A*03
86	KTPSGALHRK	C4BPA	A*03/A*11
87	SSYSRSSAVK	DCLK2	A*03
88	MLLQQPLIY	DNAH11	A*03
89	KITDFGLAK	EGFR	A*03
90	GSRLGKYVVK	EGLN3	A*03
91	SLIDRLVLY	EGLN3	A*03
92	AVLDLGSLAK	FAM149A	A*03
93	ALDKPGKSK	FAM181B	A*03
94	KTYVGHPVKM	FAT1	A*03
95	RLFESSFHY	GAL3ST1	A*03/A*29
96	FSLAGALNAGFK	GFAP	A*03
97	RMPPPLPTR	GFAP	A*03
98	KLYPTYSTK	GPLD1	A*03
99	ATMQSKLIQK	GRM8	A*03
100	ALLGVIIAK	HAVCR1	A*03
101	GVIIAKKYFFK	HAVCR1	A*03/A*11
102	IIAKKYFFK	HAVCR1	A*03
103	KSWTASSSY	LOXL2	A*03
104	STQDTLLIK	MXRA5	A*03
105	GSAALYLLR	NDUFA4L2	A*03
106	RLSPNDQYK	NDUFA4L2	A*03
107	EIYGGHHAGF	OLIG2	A*03
108	LLKSSVGNFY	PCDHB8	A*03
109	KIIAPLVTR	PLOD2	A*03/A*11
110	GTESGTILK	SEMA5B	A*03/A*11
111	KIKEHVRSK	UBD	A*03
112	KMMADYGIRK	UBD	A*03
113	VWAKILSAF	ABCB4	A*24
114	KFLDSNIKF	APOB	A*24/A*23
115	YFEEAANFL	BAAT	A*24
116	LVLDYSKDYNHW	CPS1	A*24
117	NFLPPIARF	DCBLD2	A*24
118	TYISKTIAL	EXOC3L2	A*24
119	YMKALGVGF	FABP7	A*24/B*15
120	MYAKEFDLL	FMO5	A*24
121	SYIEKVRFL	GFAP	A*24
122	KLYGMPTDFGF	GRB7	A*24/A*32

123	RQYLAINQI	ITPR2	A*24
124	EVYSPEADQW	KLHDC8A	A*24/A*25
125	IYGPKYIHPSF	MACC1	A*24/A*23
126	TFQDKTLNF	MACC1	A*24
127	IFINLSPEF	MUC5AC	A*24
128	SYTKVEARL	MUC5AC	A*24
129	VFLNQIYTQL	MUC5AC	A*24
130	VYGDGHYLTf	MUC5AC	A*24
131	KQLDHNLTf	NOX1	A*24/B*15
132	VYNPVIYVF	OPN3	A*24
133	SFDSNLLSF	PIWIL1	A*24
134	TYLTGRQF	PLCB4	A*24
135	VIAPIISNF	SLC12A2	A*24/B*15
136	EYNNIQHLF	TLR3	A*24
137	KYLSLSNSF	TLR3	A*24
138	KYLSIPTVF	UGT1A3	A*24
139	PYASLASELF	UGT1A3, UGT1A4, UGT1A5	A*24
140	KYLSIPAVF	UGT1A4, UGT1A5	A*24
141	KYLSIPAVFF	UGT1A4, UGT1A5	A*24
142	SSFPGAGNTW	WSCD1	A*24/A*25
143	FELPTGAGLQL	APOB	B*07
144	IPEPSAQQQL	APOB	B*07
145	RVPSYTLIL	APOB	B*07
146	SPGDKRLAA	APOB	B*07
147	SPIKVPLLL	APOB	B*07
148	VPDGVSKVL	APOB	B*07
149	YPLTGDTRL	APOB	B*07
150	KPSSKALGTSL	ATP10B	B*07
151	VVHPRTLIL	CYP2J2	B*07/B*15
152	IPSRLAIL	EFNA5	B*07
153	APAAVPSAPA	FEZF1	B*07
154	GPGTRLSL	GFAP	B*07
155	FPYPYAERL	GRIN2D	B*07/B*35
156	HPQVVILSL	HAVCR1	B*07/B*35
157	SPSPGKDPTL	HSF4	B*07
158	VPERGEPEL	HSF4	B*07
159	FPAHPSLLL	ITGA3	B*07
160	RPAPADSAL	KISS1R	B*07
161	NPYEGRVEV	LOXL2	B*07/B*51
162	MPMISIPRV	LPFR5	B*07/B*51
163	RPASSLRP	MMP11	B*07

164	ISTPSEVSTPL	MUC17	B*07
165	TPIAKVSEL	NKD1	B*07
166	HDPDVGSNSL	PCDHGC3	B*07
167	YPSEVEHMF	PGF	B*07/B*35
168	IPTDKLLVI	PLOD2	B*07
169	FPTEVTPHAF	PTPRZ1	B*07
170	SPMWHVQQL	QRFPR	B*07
171	APKLFVAVF	SEC14L6	B*07
172	KPAHYPLIAL	TEX11	B*07
173	MVPSAGQLALF	TGFA	B*07
174	VPSLQRLML	TLR3	B*07
175	HPIETLVDIF	VEGFA	B*07/B*35
176	AAMSRYEL	APOB	B*08
177	DLKYNALDL	APOB	B*08
178	HAKEKLTAL	APOB	B*08
179	IQIYKKLRTSSF	APOB	B*08
180	LLKAEPLAF	APOB	B*08/B*15
181	YKKLRTSSF	APOB	B*08
182	LPFLRENDL	ASTN1	B*08/B*07
183	FQKLKLLSL	ATP10B	B*08
184	EPVKKSRL	CCND1	B*08
185	NPNLKTLL	CHI3L1	B*08
186	SLIDRLVL	EGLN3	B*08/B*07
187	YVKERSKAM	EGLN3	B*08
188	SALDHVTRL	EXOC3L2	B*08
189	HIFLRTTL	ITPR2	B*08
190	SRSMRLLLL	REG4	B*08
191	LINLKYLSL	TLR3	B*08
192	LPMLKVLNL	TLR3	B*08
193	LSYNKYLQL	TLR3	B*08
194	EAKRHLLQV	UBD	B*08
195	AEAVLCTLQEL	APOB	B*44/B*40
196	AEQTGTWKL	APOB	B*44
197	EEAKQVLFL	APOB	B*44
198	FELPTGAGL	APOB	B*44/B*40
199	GEATLQRIY	APOB	B*44
200	GEELGFASL	APOB	B*44
201	GEHTSKATL	APOB	B*44
202	KEFNLQNMGL	APOB	B*44
203	KENFAGEATL	APOB	B*44
204	KESQLPTVM	APOB	B*44

205	QEVLLQTFL	APOB	B*44
206	SEPINIIDAL	APOB	B*44/B*40
207	TEATMTFKY	APOB	B*44
208	AEHDAVRNAL	ASCL2	B*44
209	YEVDTVLRV	BCAN	B*44
210	SENIVIQVY	C5	B*44
211	TEKEMIQKL	CCDC146	B*44
212	AEETCAPSV	CCND1	B*44/B*51
213	TTMDQKSLW	CHI3L2	B*44
214	AEQPDGLIL	CPS1	B*44
215	AFITAQNHGY	CPS1	B*44
216	LQEEKVPAIY	CPS1	B*44
217	NEINEKIAPSF	CPS1	B*44
218	AEGGKVPIKW	EGFR	B*44
219	AENAEYLRV	EGFR	B*44
220	KEITGFLLI	EGFR	B*44
221	AEERAEAKKKF	EGLN3	B*44
222	NEISTFHNL	GPC3	B*44
223	SEVPVARVW	IGFBP1	B*44
224	SESAVFHGF	ITGA3	B*44
225	SEAFPSRAL	KISS1R	B*44
226	EELLHGQLF	MUC5AC	B*44
227	TEHTQSQAAW	NXPH4	B*44
228	AEKQTPDGRKY	PCDHGB2	B*44
229	KESDGFHRF	PLOD2	B*44
230	AENLFRAFL	PRKDC	B*44
231	AEIHAEI	PTHLH	B*44
232	AEKDGLTDY	PTPRZ1	B*44
233	DESEKTTKSF	PTPRZ1	B*44
234	EEESLLTSF	PTPRZ1	B*44
235	EEFETLKEF	PTPRZ1	B*44
236	EEKLIQDF	PTPRZ1	B*44
237	LEMPHYSTF	PTPRZ1	B*44
238	SENPETITY	PTPRZ1	B*44
239	TEVLDSHIHAY	PTPRZ1	B*44
240	HELENHSMY	TRIM9	B*44
241	REAEPKPM	TRIO	B*44

Таблица 2: Дополнительные пептиды в соответствии с настоящим изобретением, ассоциация которых с раком не была известна ранее.

Seq ID No	Последовательность	Официальный(ые) символ(ы) гена	Аллотип HLA
242	FSDKELAAY	ABCB4	A*01
243	RSPNNFLSY	CCND1	A*01/A*03
244	RSDPVTNLV	CEACAM1, CEACAM6, CEACAM7, PSG1, PSG4, PSG5, PSG7	A*01
245	ITEKNSGLY	CEACAM5	A*01
246	YSDLHAFYY	MANEAL	A*01
247	RSDPGGGGLAY	MEX3B	A*01
248	YSHAAGQGTGLY	SOX9	A*01
249	ALFPERITV	ATAT1	A*02
250	KMILKMVQL	PRAME	A*02
251	RLASRPLLL	PTGFRN	A*02
252	RIYNGIGVSR	DCBLD2	A*03
253	KLFGTSGQK	EGFR	A*03
254	AVATKFEVVK	TRIO	A*03
255	LPDGSRVEL	ACTL8	B*07
256	LPALPQQLI	COL6A3	B*07
257	SPLRGSSSL	EFNA3, EFNA4	B*07
258	APSGTRVVQVL	PCDHGC3	B*07
259	RPAVGHSGL	ZC3H3	B*07
260	EEAPLVTKAF	ASPSCR1	B*44
261	IEALLESSL	CCND1	B*44
262	MELLLVNKL	CCND1	B*44
263	QQATPGPAY	CEA, CEACAM5, CEACAM6	B*44
264	DEYLIPQQGF	EGFR	B*44
265	EEVDVPIKLY	EPHB1, EPHB2	B*44
266	ARLTPIPFGL	TMEM64	B*44

Таблица 3: Пептиды по изобретению, полезные, например, для персонализированной противораковой терапии

Seq ID No	Последовательность	Официальный(ые) символ(ы) гена	Аллотип HLA
267	KTLGKLWRL	SOX10, SOX8, SOX9	A*02
268	DYIPYVFKL	APOB	A*24

Настоящее изобретение относится в общем к пептидам в соответствии с настоящим изобретением для применения при лечении пролиферативных заболеваний, таких как, например, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз и острый миелоидный лейкоз, и других

лимфоидных новообразований, например, неходжкинская лимфома, пост-трансплантационные лимфопролиферативные заболевания (PTLD), а также других миелоидных новообразований, таких как первичный миелофиброз, эссенциальная тромбоцитемия, истинная полицитемия, а также других новообразований, таких как рак пищевода, немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, меланома, рак молочной железы, рак желчного пузыря и холангиокарцинома, рак мочевого пузыря, рак матки, плоскоклеточная карцинома головы и шеи, мезотелиома.

Особенно предпочтительными являются пептиды – в отдельности или в комбинации – в соответствии с настоящим изобретением, выбранные из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 268. Особенно предпочтительными являются пептиды – в отдельности или в комбинации – выбранные из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 241 (см. Таблицу 1) и их применение при иммунотерапии колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы и почечно-клеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза и острого миелоидного лейкоза и других лимфоидных новообразований, например, неходжкинской лимфомы, пост-трансплантационных лимфопролиферативных заболеваний (PTLD), а также других миелоидных новообразований, таких как первичный миелофиброз, эссенциальная тромбоцитемия, истинная полицитемия, а также других новообразований, таких как рак пищевода, немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, меланома, рак молочной железы, рак желчного пузыря и холангиокарцинома, рак мочевого пузыря, рак матки, плоскоклеточная карцинома головы и шеи, мезотелиома, и, предпочтительно, колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы и почечно-клеточной карциномы.

Другой аспект настоящего изобретения относится к применению пептидов в соответствии с настоящим изобретением – предпочтительно в комбинации – для

лечения пролиферативного заболевания, выбранного из группы: колоректальный рак, глиобластома, рак желудка, гепатоклеточная карцинома и почечно-клеточная карцинома, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз и острый миелоидный лейкоз и других лимфоидных новообразований, например, неходжкинской лимфомы, пост-трансплантационных лимфопролиферативных заболеваний (PTLD), а также других миелоидных новообразований, таких как первичный миелофиброз, эссенциальная тромбоцитемия, истинная полицитемия, а также других новообразований, таких как рак пищевода, немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, меланома, рак молочной железы, рак желчного пузыря и холангиокарцинома, рак мочевого пузыря, рак матки, плоскоклеточная карцинома головы и шеи, мезотелиома.

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

Настоящее изобретение далее относится к пептидам в соответствии с настоящим изобретением, где указанные пептиды (каждый из них) состоят или состоят по существу из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 268.

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

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

последовательность), таким как, например, антителом, специфичным для дендритных клеток.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Настоящее изобретение далее относится к способу в соответствии с настоящим изобретением, где антигенпрезентирующая клетка включает вектор экспрессии, способный экспрессировать или экспрессирующий указанный пептид, содержащий последовательность с SEQ ID NO. 1 по SEQ ID NO. 268, предпочтительно содержащий SEQ ID NO. 1 по SEQ ID NO. 241 или его вариантную аминокислотную последовательность.

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

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

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

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

Настоящее изобретение далее относится к применению в соответствии с настоящим изобретением, где указанные раковые клетки являются клетками колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы и почечно-клеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза и острого миелоидного лейкоза и других лимфоидных новообразований, например, неходжкинской лимфомы, пост-трансплантационных лимфопролиферативных заболеваний (PTLD), а также других миелоидных новообразований, таких как первичный миелофиброз, эссенциальная тромбоцитемия, истинная полицитемия, а также других новообразований, таких как рак пищевода, немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, меланома, рак молочной железы, рак желчного пузыря и холангиокарцинома, рак мочевого пузыря, рак

матки, плоскоклеточная карцинома головы и шеи, мезотелиома, и, предпочтительно, колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы и почечно-клеточной карциномы.

Настоящее изобретение далее относится к биомаркерам на основе пептидов в соответствии с настоящим изобретением, в контексте изобретения называемые «мишенями», которые могут быть использованы при постановке диагноза рака, предпочтительно колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы и почечно-клеточной карциномы. В роли маркера может выступать избыточная презентация самого(их) пептида(ов) или избыточная экспрессия соответствующего(их) гена(ов). Эти маркеры могут также использоваться для предсказания вероятности успеха лечения, предпочтительно иммунотерапии, и, наиболее предпочтительно, иммунотерапии, направленной на ту же мишень, которая была идентифицирована биомаркером. Например, для окрашивания срезов опухоли для выявления присутствия интересующего пептида в комплексе с МНС может использоваться антитело или растворимый ТКР.

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

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

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

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

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

Понятие «пептид» в контексте настоящего описания обозначает серии аминокислотных остатков, связанных друг с другом обычно пептидными связями между альфа-аминными и карбонильными группами смежных аминокислот. Пептиды предпочтительно имеют длину в 9 аминокислот, но могут быть короче – 8 аминокислот в длину, и длиннее – 10, 11 или 12 или длиннее и в случае пептидов, связанных с молекулами МНС II класса (удлиненные варианты пептидов по изобретению), они могут иметь длину в 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 или более аминокислот.

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

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

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

Пептид, олигопептид, белок или полинуклеотид, кодирующий такую молекулу, является «иммуногенным» (и, таким образом, «иммуногеном» в рамках настоящего изобретения), если он способен индуцировать иммунный ответ. В случае настоящего изобретения иммуногенность получает более специфическое определение как способность индуцировать Т-клеточный ответ. Таким образом, «иммуноген» будет представлять собой молекулу, которая способна индуцировать иммунный ответ, и, в случае настоящего изобретения, молекулу, способную

индуцировать Т-клеточный ответ. В другом аспекте иммуноген может быть пептидом, комплексом пептида и МНС, олигопептидом и/или белком, используемым для получения специфических антител или ТКР против него.

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

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

Таблица 4: Значения частоты экспрессии F для серотипов HLA-A*02, HLA-A*01, HLA-A*03, HLA-A*24, HLA-B*07, HLA-B*08 и HLA-B*44. Частоты встречаемости гаплотипов Gf получены из исследования, в котором использовались данные HLA-типирования из реестра для более чем 6,5 миллионов доноров-добровольцев из США (Gragert et al., 2013). Частота гаплотипа - это частота обособленного аллеля на отдельной хромосоме. В связи с диплоидным набором хромосом в клетках млекопитающих частота встречаемости этого аллеля в генотипе выше и может быть рассчитана при помощи принципа Харди-Вайнберга ($F = 1 - (1 - Gf)^2$).

Аллель	Популяция	Рассчитанный фенотип по частоте аллеля (F)
A*02	Афроамериканцы (N=28557)	32,3%
	Белые европейцы (N=1242890)	49,3%
	Японцы (N=24582)	42,7%

	Латиноамериканцы, Юж. + Центр. Амер. (N=146714)	46,1%
	Юго-восточные азиаты (N=27978)	30,4%
A*01	Афроамериканцы (N=28557)	10,2%
	Белые европейцы (N=1242890)	30,2%
	Японцы (N=24582)	1,8%
	Латиноамериканцы, Юж. + Центр. Амер. (N=146714)	14,0%
	Юго-восточные азиаты (N=27978)	21,0%
A*03	Афроамериканцы (N=28557)	14,8%
	Белые европейцы (N=1242890)	26,4%
	Японцы (N=24582)	1,8%
	Латиноамериканцы, Юж. + Центр. Амер. (N=146714)	14,4%
	Юго-восточные азиаты (N=27978)	10,6%
A*24	Афроамериканцы (N=28557)	2,0%
	Белые европейцы (N=1242890)	8,6%
	Японцы (N=24582)	35,5%
	Латиноамериканцы, Юж. + Центр. Амер. (N=146714)	13,6%
	Юго-восточные азиаты (N=27978)	16,9%
B*07	Афроамериканцы (N=28557)	14,7%
	Белые европейцы (N=1242890)	25,0%
	Японцы (N=24582)	11,4%
	Латиноамериканцы, Юж. + Центр. Амер. (N=146714)	12,2%
	Юго-восточные азиаты (N=27978)	10,4%
B*08	Афроамериканцы (N=28557)	6,0%
	Белые европейцы (N=1242890)	21,6%
	Японцы (N=24582)	1,0%
	Латиноамериканцы, Юж. + Центр. Амер. (N=146714)	7,6%
	Юго-восточные азиаты (N=27978)	6,2%

В*44	Афроамериканцы (N=28557)	10,6%
	Белые европейцы (N=1242890)	26,9%
	Японцы (N=24582)	13,0%
	Латиноамериканцы, Юж. + Центр. Амер. (N=146714)	18,2%
	Юго-восточные азиаты (N=27978)	13,1%

Пептиды по изобретению, предпочтительно когда они включены в состав вакцины по изобретению согласно описанию в настоящем документе, связываются с аллелем А*02, А*01, А*03, А*24, В*07, В*08 или В*44. Вакцина также может включать универсальные пептиды, связывающиеся с МНС II класса. Поэтому вакцина по изобретению может применяться для лечения рака у пациентов, которые являются А*02-, А*01-, А*03-, А*24-, В*07-, В*08- или В*44-положительными, причем в связи с универсальной по связыванию природе данных пептидов не нужен подбор аллотипов МНС II класса.

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

Таблица 5: Охват аллелей HLA в популяции европеоидной расы (рассчитано в соответствии с (Gragert et al., 2013)).

	Охват (не менее одного А-аллеля)	в комбинации с В*07	в комбинации с В*44	в комбинации с В*07 и В*44
A*02 / A*01	70%	78%	78%	84%
A*02 / A*03	68%	76%	76%	83%
A*02 / A*24	61%	71%	71%	80%
A*01 / A*03	52%	64%	65%	75%
A*01 / A*24	44%	58%	59%	71%
A*03 / A*24	40%	55%	56%	69%
A*02 / A*01 / A*03	84%	88%	88%	91%
A*02 / A*01 / A*24	79%	84%	84%	89%
A*02 / A*03 / A*24	77%	82%	83%	88%
A*01 / A*03 / A*24	63%	72%	73%	81%
A*02 / A*01 / A*03 / A*24	90%	92%	93%	95%

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

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

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

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

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

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

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

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

Понятие «сегмент ДНК» относится к полимеру ДНК в виде отдельного фрагмента или в качестве компонента более крупной конструкции ДНК, которая была

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

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

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

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

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

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

такой иммунный ответ принимает форму стимуляции Т-клеточного ответа у животного-реципиента, такого как человек. Альтернативно «активный фрагмент» может также быть использован для инициации ответа Т-клетки *in vitro*.

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

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

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

где «С» является числом различий между Контрольной последовательностью и Сравниваемой последовательностью по длине выравнивания между Контрольной последовательностью и Сравниваемой последовательностью, где

- (i) (i) каждое основание или аминокислота в Контрольной последовательности, которые не имеют соответствующего выравненного основания или аминокислоты в Сравниваемой последовательности, и
- (ii) каждая брешь в Контрольной последовательности и

(iii) каждое выравненное основание или аминокислота в Контрольной последовательности, которые отличаются от выравненного основания или аминокислоты в Сравниваемой последовательности, представляют собой различие; и

(iiii) выравнивание должно начинаться с позиции 1 выравненных последовательностей;

и «R» - это число оснований или аминокислот в Контрольной последовательности по длине выравнивания со Сравниваемой последовательностью с любой брешью, образующейся в Контрольной последовательности, считающейся также за основание или аминокислоту.

Если существует противопоставление между Сравниваемой последовательностью и Контрольной последовательностью, для которых процентная доля идентичности, по расчетам выше, приблизительно равна или выше установленной минимальной Процентной доли идентичности, тогда Сравниваемая последовательность имеет установленную минимальную процентную долю идентичности с Контрольной последовательностью, если даже могут существовать выравнивания, в которых подсчитанная здесь выше процентная доля идентичности меньше, чем установленная процентная доля идентичности.

Как было упомянуто выше, в настоящем изобретении, таким образом, предложен пептид, включающий последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 268 или ее вариант, который на 88% гомологичен последовательностям с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 268, или их варианту, который индуцирует перекрестную реакцию Т-клеток с указанным пептидом. Пептиды по изобретению обладают способностью связываться с молекулой главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) I класса или – удлиненные версии упомянутых пептидов – с МНС II класса.

В настоящем изобретении термин «гомологичный» относится к степени идентичности (см. выше, Процентная доля идентичности) между

последовательностями двух аминокислотных последовательностей, т. е. пептидных или полипептидных последовательностей. Упомянутая ранее «гомология» определяется при сравнении двух последовательностей, сопоставляемых в оптимальных условиях для сравниваемых последовательностей. Такая гомология последовательностей может быть подсчитана с помощью создания выравнивания, например, по алгоритму ClustalW. Широко распространено программное обеспечение для анализа последовательностей, в частности, Vector NTI, GENETYX или другие инструменты, предоставляемые банками данных свободного доступа.

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

Под «вариантом» данной аминокислотной последовательности авторы изобретения имеют в виду, что боковые цепи, например, одного или двух аминокислотных остатков, изменены (например, путем их замещения боковой цепью остатка другой встречающейся в природе аминокислоты или какой-либо другой боковой цепью) так, что пептид по-прежнему способен связываться с молекулой HLA по существу таким же путем, как и пептид, состоящий из данной аминокислотной последовательности с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 268. Например, пептид может быть модифицирован таким образом, что он по меньшей мере сохранит, если не улучшит, способность взаимодействовать и связываться со связывающей бороздкой подходящей молекулы MHC, такой как HLA-A*02 или -DR, и, таким образом, он по меньшей мере сохранит, если не улучшит, способность связываться с ТКР активированных Т-клеток.

Данные Т-клетки могут затем вступать в перекрестную реакцию с клетками и уничтожать клетки, которые экспрессируют полипептид, который содержит природную аминокислотную последовательность родственного пептида, как

определено в аспектах этого изобретения. По информации из научной литературы и банков данных (Rammensee et al., 1999; Godkin et al., 1997), конкретные позиции связывающихся с HLA пептидов являются типичными якорными остатками, формирующими центральную последовательность, подходящую к соединительному элементу рецептора HLA, который определяется полярными, электрофизическими, гидрофобными и пространственными свойствами полипептидных цепей, образующих связывающую бороздку. Так, специалист данной области будет в состоянии модифицировать аминокислотные последовательности с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 268, сохраняя известные якорные остатки, и будет в состоянии определить, сохранят ли такие варианты способность связываться с молекулами MHC I или II класса. Варианты по настоящему изобретению сохраняют способность связываться с ТКР активированных Т-клеток, которые могут впоследствии вступать в перекрестную реакцию и уничтожать клетки, экспрессирующие полипептид, который содержит природную аминокислотную последовательность родственного пептида, как определено в аспектах настоящего изобретения.

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

между исходной аминокислотой и ее заменой; и таковой является основа определения «консервативных замен».

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

Менее консервативные замены могут охватывать замену одной аминокислоты другой, имеющей похожие характеристики, но отличающейся в какой-то степени по размеру, как в случае замены аланина остатком изолейцина. Высоко неконсервативные замены могут охватывать замену кислой аминокислоты полярной, или даже такой, которая имеет основной характер. Такие «радикальные» замены не могут, однако, быть отвергнуты как потенциально неэффективные из-за того, что химические эффекты не полностью предсказуемы, и радикальные замены могут неожиданно привести к благоприятным эффектам, не предсказуемым исходя из обычных химических принципов.

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

Если были произведены замены в более чем одной позиции с получением пептида с по существу эквивалентной или большей антигенной активностью, как определено ниже, то комбинации таких замен будут проанализированы для определения того, приведут ли эти комбинации замен к дополнительным или синергическим эффектам по отношению к антигенности пептида. По большей части не более 4 позиций внутри пептида должны замещаться одновременно.

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

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

										I	
										L	
Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
SEQ ID No 125	I	Y	G	P	K	Y	I	H	P	S	F
Вариант											I
											L
		F									I
		F									L
		F									
Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
SEQ ID No 160	R	P	A	P	A	D	S	A	L		
Вариант									F		
									V		
									M		
									A		
									I		
Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
SEQ ID No 255	L	P	D	G	S	R	V	E	L		
Вариант									F		
									V		
									M		
									A		
									I		
Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
SEQ ID No 178	H	A	K	E	K	L	T	A	L		
Вариант									V		
									I		
									M		
									F		
					R						
					R				V		
					R				I		
					R				M		
					R				F		
					H						
					H				V		
					H				I		
					H				M		

					H				F		
			R								
			R						V		
			R						I		
			R						M		
			R						F		
			R		R						
			R		R				V		
			R		R				I		
			R		R				M		
			R		R				F		
			R		H						
			R		H				V		
			R		H				I		
			R		H				M		
			R		H				F		
			L								
			L						V		
			L						I		
			L						M		
			L						F		
			L		R						
			L		R				V		
			L		R				I		
			L		R				M		
			L		R				F		
			L		H						
			L		H				V		
			L		H				I		
			L		H				M		
			L		H				F		
Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
SEQ ID No 183	F	Q	K	L	K	L	L	S	L		
Вариант									V		
									I		
									M		
									F		
					R						
					R				V		
					R				I		

									Y		
									L		
		D									
		D							W		
		D							Y		
		D							L		
Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
SEQ ID No 232	A	E	K	D	G	K	L	T	D	Y	
Вариант										F	
										W	
										L	
		D								F	
		D								W	
		D									
		D								L	

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

Пептиды по изобретению могут быть удлинены с помощью вплоть до четырех аминокислот, это значит, что 1, 2, 3 или 4 аминокислоты могут быть добавлены к одному из концов в любой комбинации, представленной между 4:0 и 0:4. Комбинации элонгаций в соответствии с изобретением могут быть взяты из Таблицы 7.

Таблица 7: Комбинации элонгаций пептидов по изобретению

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

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

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

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

В альтернативном варианте осуществления пептид удлинен с одной или другой стороны или с двух сторон одновременно добавлением более 4 аминокислот, предпочтительно, до общей длины вплоть до 30 аминокислот. Это может привести к образованию пептидов, связывающихся с МНС II класса. Связывание с МНС II класса может быть проверено известными из уровня техники способами.

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

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

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

В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения пептид состоит или по существу состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 268.

«Состоит по существу из» подразумевает, что пептид в соответствии с настоящим изобретением, помимо любой из последовательностей с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 268, или его вариант, содержит дополнительные находящиеся на N- и/или С-конце фрагменты последовательности аминокислот, которые не являются обязательно формирующими часть пептида, которая функционирует как эпитоп для молекул МНС.

Тем не менее, эти фрагменты могут быть важны для обеспечения эффективного введения пептида в соответствии с настоящим изобретением в клетки. В одном варианте осуществления настоящего изобретения пептид является частью слитого белка, которая включает, например, 80 N-терминальных аминокислот антиген-

ассоциированной инвариантной цепи (р33, в дальнейшем «Ii») HLA-DR, как взятый из банка данных NCBI, инвентарный номер - GenBank Accession-number X00497. В других видах слияния пептиды по настоящему изобретению могут быть слиты с антителом, описанным в настоящем документе, или его функциональной частью, в частности встроены в последовательность антитела, чтобы быть специфической мишенью указанного антитела, или, например, слиты с или встроены в антитело, являющееся специфичным для дендритных клеток, описанных в настоящей заявке.

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

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

Непептидной связью является, например, -CH₂-NH-, -CH₂S-, -CH₂CH₂-, -CH=CH-, -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- и -CH₂SO-. В патенте США № 4 897 445 предлагается метод твердофазного синтеза непептидных связей (-CH₂-NH) в полипептидных цепях, который включает полипептиды, синтезированные с использованием стандартной методики, и непептидную связь, синтезированную при реакции аминокальдегида и аминокислоты в присутствии NaCNBH₃.

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

Кроме того, все пептиды по изобретению могут быть синтезированы в целях изменения их пространственной конфигурации. Например, может быть использован D-изомер одного или нескольких аминокислотных остатков пептида, а не обычный L-изомер. Более того, по меньшей мере один из аминокислотных остатков пептидов по изобретению может быть замещен одним из хорошо известных не встречающихся в природе аминокислотных остатков. Изменения, такие как данные, могут служить для повышения стабильности, биологической доступности и/или связывающих свойств пептидов по изобретению.

Подобным образом, пептид или вариант по изобретению может быть модифицирован химическим способом посредством реакции отдельных аминокислот как до, так и после синтеза пептида. Примеры таких модификаций хорошо известны из уровня техники и обобщаются, например, в работе R. Lundblad, *Chemical Reagents for Protein Modification*, 3rd ed. CRC Press, 2004 (Lundblad, 2004), которая включена сюда путем ссылки. Химическая модификация аминокислот включает, но без ограничения, модификацию с помощью ацилирования, амидинирования, пиридоксилирования лизина, восстановительного алкилирования, тринитробензилирования аминных групп 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислотой (TNBS), амидную модификацию

карбоксильных групп и сульфгидрильную модификацию с помощью окисления надмуравьиной кислотой цистеина до цистеиновой кислоты, образование производных ртути, образование смешанных дисульфидов с другими тиоловыми соединениями, реакцию с малеимидом, карбоксиметилирование йодоуксусной кислотой или йодацетамидом и карбамоилирование цианатом при щелочном уровне pH, хотя не ограничиваясь ими. В этой связи специалист данной области может проконсультироваться с главой 15 в работе *Current Protocols In Protein Science*, Eds. Hassan и соавт. (John Wiley and Sons NY 1995-2000) (Coligan et al., 1995) для получения более обширной информации о методах, связанных с химической модификацией белков.

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

Распространено также избирательное восстановление дисульфидных связей в белках. Дисульфидные связи могут быть образованы и окислены во время тепловой обработки биофармацевтических средств. К-реагент Вудворда может использоваться для модификации определенных остатков глютаминовой кислоты. N-(3-(диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимид может использоваться для образования внутримолекулярных поперечных связей между остатком лизина и остатком глютаминовой кислоты. Например, диэтилпирокарбонат является реагентом для модификации гистидильных остатков в белках. Гистидин может также быть модифицирован при использовании 4-гидрокси-2-ноненаля. Реакция остатков лизина и других α -аминных групп полезна, например, при связывании

пептидов с поверхностями или поперечной сшивке белков/пептидов. Лизин является сайтом присоединения полиэтиленгликоля и основным сайтом модификации при гликозилировании белков. Остатки метионина в белках могут быть модифицированы, например, с помощью йодацетамида, бромэтиламина и хлорамина T.

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

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

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

Пептид или вариант, в котором пептид модифицирован или включает непептидные связи, является предпочтительным вариантом осуществления изобретения.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к не встречающемуся в природе пептиду, где указанный пептид состоит или состоит по существу из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 268 и был получен синтетическим способом (например, синтезирован) в виде фармацевтически приемлемой соли. Способы синтетического получения пептидов хорошо известны в данной области. Соли пептидов в соответствии с настоящим изобретением существенно отличаются от пептидов по своему

состоянию(ям) *in vivo*, так как синтезированные пептиды не являются солями *in vivo*. Не встречающаяся в природе солевая форма пептида опосредует растворимость пептида, в частности, в контексте фармацевтических композиций, включающих пептиды, например вакцин на основе пептидов, раскрытых в настоящем описании. Достаточная и по меньшей мере существенная растворимость пептида(ов) необходима для эффективного введения пептидов субъекту, подлежащему лечению. Предпочтительно, если соли являются фармацевтически приемлемыми солями пептидов. Соли в соответствии с изобретением включают щелочные и щелочноземельные соли, такие как соли рядов Гофмейстера, включающие в качестве анионов PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , CH_3COO^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , ClO_4^- , I^- , SCN^- и в качестве катионов NH_4^+ , Rb^+ , K^+ , Na^+ , Cs^+ , Li^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} и Ba^{2+} . В частности, соли выбраны из $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, NH_4Cl , NH_4Br , NH_4NO_3 , NH_4ClO_4 , NH_4I , NH_4SCN , Rb_3PO_4 , Rb_2HPO_4 , RbH_2PO_4 , Rb_2SO_4 , $\text{Rb}_4\text{CH}_3\text{COO}$, Rb_4Cl , Rb_4Br , Rb_4NO_3 , Rb_4ClO_4 , Rb_4I , Rb_4SCN , K_3PO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , K_2SO_4 , KCH_3COO , KCl , KBr , KNO_3 , KClO_4 , KI , KSCN , Na_3PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , Na_2SO_4 , NaCH_3COO , NaCl , NaBr , NaNO_3 , NaClO_4 , NaI , NaSCN , ZnCl_2 , Cs_3PO_4 , Cs_2HPO_4 , CsH_2PO_4 , Cs_2SO_4 , CsCH_3COO , CsCl , CsBr , CsNO_3 , CsClO_4 , CsI , CsSCN , Li_3PO_4 , Li_2HPO_4 , LiH_2PO_4 , Li_2SO_4 , LiCH_3COO , LiCl , LiBr , LiNO_3 , LiClO_4 , LiI , LiSCN , Cu_2SO_4 , $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$, Mg_2HPO_4 , $\text{Mg}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, Mg_2SO_4 , $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, MgCl_2 , MgBr_2 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$, MgI_2 , $\text{Mg}(\text{SCN})_2$, MnCl_2 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, Ca_2HPO_4 , $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, CaSO_4 , $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, CaCl_2 , CaBr_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$, CaI_2 , $\text{Ca}(\text{SCN})_2$, $\text{Ba}_3(\text{PO}_4)_2$, Ba_2HPO_4 , $\text{Ba}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, BaSO_4 , $\text{Ba}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, BaCl_2 , BaBr_2 , $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$, BaI_2 и $\text{Ba}(\text{SCN})_2$. Особенно предпочтительными являются ацетат NH_4 , MgCl_2 , KH_2PO_4 , Na_2SO_4 , KCl , NaCl и CaCl_2 , такие как например, хлоридные или ацетатные (трифторацетатные) соли.

Как правило, пептиды и варианты (по меньшей мере те, что содержат пептидные связи между аминокислотными остатками) могут быть синтезированы Fmoc-полиамидным способом твердофазного синтеза пептидов, как раскрыто у Lukas и соавт. (Lukas et al., 1981) и в прилагающихся ссылках. Временная защита N-аминогруппы производится 9-флуоренилметилоксикарбонильной (Fmoc) группой.

Повторное расщепление этой высоко щелочелабильной защитной группы осуществляется при использовании 20% пиперидина в N, N-диметилформамиде. Функциональные группы боковой цепи могут быть защищены получением таких соединений, как их бутиловые эфиры (в случае серина, треонина и тирозина), бутиловые сложные эфиры (в случае глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты), бутилоксикарбонильное производное (в случае лизина и гистидина), тритильное производное (в случае цистеина) и производное 4-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфонила (в случае аргинина). Если глютамин или аспарагин являются С-терминальными остатками, для защиты амидогруппы боковой цепи используется 4,4'-диметоксибензгидрильная группа. Твердофазный носитель основан на полимере полидиметилакриламиде, состоящем из трех мономеров: диметилакриламида (каркасный мономер), бис-акрилоилэтилендиамин (компонент для перекрестной сшивки, линкер) и метилового эфира акрилоилсаркозина (функционализирующий агент). Для образования легкорасщепляемой связи пептида и смолы используется нестойкое к действию кислот производное 4-гидроксиметилфеноксиксусной кислоты. Все аминокислотные производные добавляются в виде предварительно синтезированных симметричных ангидридных производных за исключением аспарагина и глютамина, которые добавляются с применением обратной реакции соединения, опосредованной N, N-дициклогексилкарбодиимид/1-гидроксibenзотриазолом. Все реакции сочетания и снятия защитных групп отслеживались с помощью методов контроля с применением нингидрина, тринитробензолсульфоновой кислоты или изотина. После завершения синтеза пептиды отщепляются от смолы-носителя с сопутствующим удалением защитных групп боковой цепи при обработке 95% трифторуксусной кислотой, содержащей 50 % смеси поглотителей. Обычно используемые поглотители включают этандитиол, фенол, анизол и воду, окончательный выбор зависит от составляющих аминокислот синтезируемого пептида. Также возможна комбинация твердофазных и жидкофазных методов синтеза пептидов (см., например, (Bruckdorfer et al., 2004), и прилагаемые ссылки).

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

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

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

Для идентификации и относительной количественной оценки лигандов HLA с помощью масс-спектрометрического анализа молекулы HLA из подвергнутых шоковой заморозке образцов тканей были очищены и из них выделены HLA-ассоциированные пептиды. Выделенные пептиды были разделены и последовательности были идентифицированы с помощью методов жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (LC-MS) с ионизацией электрораспылением (nanoESI) в режиме реального времени. Полученные пептидные последовательности подтверждали сравнением картины фрагментации природных опухолеассоциированных пептидов (TUMAP), записанной на образцах колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы и почечно-клеточной карциномы (N = 35 образцов КРК, 12 ГБМ, 10 РЖ, 22 ГЖК и 79

ПКК), с картинками фрагментации соответствующих синтетических контрольных пептидов с идентичными последовательностями. Поскольку пептиды были идентифицированы непосредственно в качестве лигандов молекул HLA первичных опухолей, то эти результаты дают прямое доказательство естественного процессирования и презентации идентифицированных пептидов на ткани первичной раковой опухоли, полученной от 158 пациентов с колоректальным раком, глиобластомой, раком желудка, гепатоклеточной карциномой и почечно-клеточной карциномой (ср. С Примером 1).

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

Комплексы HLA-пептид из образцов ткани колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы и почечно-клеточной карциномы были очищены, и HLA-ассоциированные пептиды были выделены и проанализированы методом ЖХ-МС (см. Пример 1). Все TUMAP, содержащиеся в настоящей патентной заявке, были идентифицированы с помощью данного подхода на образцах первичных раковых опухолей: колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы и почечно-клеточной карциномы, что

подтверждает их презентацию на клетках первичных раковых опухолей: колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы и почечно-клеточной карциномы.

Кроме презентации пептида была исследована экспрессия мРНК лежащего в основе гена. Данные по мРНК, полученные с помощью секвенирования РНК (RNASeq) из нормальных тканей и раковых тканей (ср. с Примером 2, Фигурой 1). Пептиды, которые получены из белков, которые кодируются мРНК, демонстрирующей высокую степень экспрессии в раковой ткани, но ее очень низкий уровень или отсутствие в жизненно важных нормальных тканях, были включены как предпочтительные в настоящее изобретение.

В настоящем изобретении предложены пептиды, которые пригодны для лечения раковых заболеваний / опухолей, предпочтительно колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы и почечно-клеточной карциномы, клетки которых презентируют в избытке или исключительно пептиды по изобретению. Как показал масс-спектрометрический анализ, эти пептиды естественно презентировались молекулами HLA на образцах первичных раковых опухолей: колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы и почечно-клеточной карциномы человека.

Многие из исходных генов/белков (называемых также «белками полной длины» или «базовыми белками»), из которых были получены пептиды, были в высокой степени избыточно экспрессированы в клетках рака по сравнению с нормальными тканями – понятие «нормальные ткани» в связи с настоящим изобретением подразумевает здоровые клетки головного мозга, клетки почки, клетки печени, клетки толстой кишки, клетки желудка или клетки других нормальных тканей, демонстрирующие высокую степень ассоциации исходных генов с опухолью (см. Пример 2). Более того, сами пептиды презентируются на опухолевой ткани – понятие «опухолевая ткань» в связи с данным изобретением подразумевает образец ткани пациента,

страдающего колоректальным раком, глиобластомой, раком желудка, гепатоклеточной карциномой и почечно-клеточной карциномой.

Связанные с HLA пептиды могут распознаваться иммунной системой, конкретно Т-лимфоцитами. Т-клетки могут разрушать клетки, презентирующие распознанный комплекс HLA/пептид; к примеру, клетки колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы и почечно-клеточной карциномы, презентирующие полученные пептиды.

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

Настоящее описание далее относится к Т-клеточным рецепторам (ТКР), включающим альфа-цепь и бета-цепь («альфа/бета-ТКР»). Также предложены пептиды в соответствии с изобретением, способные связываться с ТКР и антителами, если они презентируются молекулой МНС.

Настоящее описание также относится к фрагментам ТКР в соответствии с изобретением, которые способны связываться с пептидным антигеном в соответствии с настоящим изобретением, когда они презентируются молекулой HLA. Данный термин в частности относится к растворимым фрагментам ТКР, например, ТКР без трансмембранных сегментов и/или константным участкам, одноцепочечным ТКР и продуктам их слияния, например, с Ig.

Настоящее описание также относится к нуклеиновым кислотам, векторам и клеткам-хозяевам для экспрессии ТКР и пептидам по настоящему изобретению; и методам их применения.

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

В одном варианте осуществления согласно описанию предложен способ получения ТКР, согласно настоящему описанию, при чем способ включает культивацию клетки-хозяина, способной экспрессировать ТКР в условиях, подходящих для стимуляции экспрессии ТКР.

Настоящее описание в другом аспекте далее относится к способам в соответствии с настоящим описанием, где антиген нагружен на молекулы МНС I или II класса, экспрессированные на поверхности подходящей антигенпрезентирующей клетки или искусственной антигенпрезентирующей клетки, при контактировании

достаточного количества антигена с антигенпрезентирующей клеткой, или же антиген нагружен на тетрамеры МНС I или II класса путем тетрамеризации комплексов антиген-мономер МНС I или II класса.

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

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

ТКР по настоящему изобретению предпочтительно связываются с комплексом пептида и молекулы HLA с аффинностью связывания (KD) около 100 мкМ или ниже, около 50 мкМ или ниже, около 25 мкМ или ниже или около 10 мкМ или ниже. Более предпочтительными являются высокоаффинные ТКР с аффинностью связывания, составляющей около 1 мкМ или ниже, около 100 нМ или ниже, около 50 нМ или ниже, около 25 нМ или ниже. Неограничивающие примеры диапазонов предпочтительной аффинности связывания для ТКР по настоящему изобретению

включают значения от около 1 нМ до около 10 нМ; от около 10 нМ до около 20 нМ; от около 20 нМ до около 30 нМ; от около 30 нМ до около 40 нМ; от около 40 нМ до около 50 нМ; от около 50 нМ до около 60 нМ; от около 60 нМ до около 70 нМ; от около 70 нМ до около 80 нМ; от около 80 нМ до около 90 нМ; и от около 90 нМ до около 100 нМ.

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

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

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

ТКР по настоящему изобретению могут включать поддающуюся обнаружению метку, выбранную из группы, состоящей из радионуклида, флуорофора и биотина. ТКР по настоящему изобретению могут конъюгированы с терапевтически активным

ингредиентом, таким как радионуклид, химиотерапевтическим средством или токсином.

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

В одном варианте осуществления ТКР, содержащий по меньшей мере одну мутацию в альфа-цепи ТКР и/или бета-цепи ТКР, имеет аффинность связывания по отношению к и/или полупериод связывания по отношению к комплексу пептида и молекулы HLA, которые по меньшей мере вдвое выше, чем у ТКР, содержащего альфа-цепь ТКР без мутаций и/или бета-цепь ТКР без мутаций. Усиление аффинности опухолеспецифических ТКР, а также ее использование, опирается на существование «окна» с оптимальными показателями аффинности для ТКР. Существование такого окна основано на наблюдениях, что ТКР, специфические для HLA-A2-рестриктированных патогенов, обладают показателями KD, которые, в основном, примерно в 10 раз ниже по сравнению с ТКР, специфическими для HLA-A2-рестриктированных опухолеассоциированных аутоантигенов. Сейчас известно, хотя опухолевые антигены имеют иммуногенный потенциал, поскольку опухоли возникают из собственных клеток индивида, только мутантные белки или белки с изменениями в трансляционном процессинге будут восприниматься иммунной системой как чужеродные. Антигены, уровень которых повышен или которые экспрессируются в избытке (так называемые аутоантигены), не будут в обязательном порядке вызывать функциональный иммунный ответ против опухоли: Т-клетки, экспрессирующие ТКР, которые являются высоко активными по отношению к данным антигенам, будут подвергаться отрицательному отбору внутри вилочковой железы в процессе, известном как центральная толерантность, что означает, что останутся лишь Т-клетки с низкоаффинными ТКР к аутоантигенам. Поэтому аффинность ТКР или вариантов согласно настоящему

описанию по отношению к пептидам может быть усилена способами, хорошо известными из уровня техники.

Настоящее описание относится далее к способу идентификации и выделения ТКР в соответствии с настоящим описанием, причем указанный способ включает инкубацию МКПК HLA-A*02-отрицательных здоровых доноров с A2/пептидными мономерами, инкубацию МКПК с тетрамер-фикоэритрином (PE) и выделение Т-клеток с высокой авидностью с помощью сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS)–Calibur.

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

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

В другом аспекте для получения Т-клеток, экспрессирующих ТКР согласно настоящему описанию, РНК ТКР синтезируют с помощью методик, известных из уровня техники, например, транскрипционные системы *in vitro*. Синтезированные *in*

in vitro РНК ТКР затем вводят с помощью электропорации в первичные CD8⁺ Т-клетки, полученные у здоровых доноров, в целях повторной экспрессии альфа- и/или бета-цепей опухолеспецифических ТКР.

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

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

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

Для достижения высоких уровней экспрессии ТКР на поверхности требуется транскрипция высоких уровней как цепей ТКР-альфа, так и ТКР-бета, введенного ТКР. Для этого цепи ТКР-альфа и ТКР-бета согласно настоящему описанию могут быть клонированы в бицистронные конструкции в одном векторе, который, как было показано, способен преодолеть данное препятствие. Использование участка

внутренней посадки рибосомы вируса (IRES) между цепями ТКР-альфа и ТКР-бета приводит к скоординированной экспрессии обеих цепей, поскольку цепи ТКР-альфа и ТКР-бета образуются из одного транскрипта, который разделяется на два белка во время трансляции, обеспечивая получение равного молярного соотношения цепей ТКР-альфа и ТКР-бета (Schmitt et al., 2009).

Нуклеиновые кислоты, кодирующие ТКР согласно настоящему описанию, могут быть кодон-оптимизированы для увеличения экспрессии клеткой-хозяином. Избыточность генетического кода позволяет кодирование некоторых аминокислот более чем одним кодоном, однако некоторые конкретные кодоны менее «оптимальны», чем другие, по причине относительной доступности подходящих тРНК, а также других факторов (Gustafsson et al., 2004). Как было показано, модификации последовательностей генов ТКР-альфа и ТКР-бета, так чтобы каждая аминокислота кодировалась оптимальным кодоном для экспрессии генов млекопитающих, а также удаление нестабильных мотивов мРНК или криптических сайтов сплайсинга, существенно усиливали экспрессию генов ТКР-альфа и ТКР-бета (Scholten et al., 2006).

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

Для снижения ошибочного спаривания С-концевой домен введенных цепей ТКР согласно настоящему описанию может быть модифицирован в целях стимуляции межцепочечной аффинности, при этом снижая способность введенных цепей спариваться с эндогенным ТКР. Данные стратегии могут включать замещение С-концевых доменов ТКР-альфа и ТКР-бета-цепей человека их мышинными

эквивалентами (С-концевой «муринизированный» домен); получение второй межцепочечной дисульфидной связи в С-концевом домене за счет введения второго остатка цистеина в обе цепи: ТКР-альфа и ТКР-бета введенного ТКР (модификация цистеином); обмен взаимодействующими остатками в С-концевом домене ТКР-альфа и ТКР-бета-цепей («выступ-во-впадину»); и слияние переменных доменов цепей ТКР-альфа и ТКР-бета непосредственно с CD3 ζ (слияние CD3 ζ) (Schmitt et al., 2009).

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

«Фармацевтическая композиция» является композицией, подходящей для введения человеку в медицинском учреждении. Предпочтительно, если фармацевтическая композиция является стерильной и произведена в соответствии с правилами GMP (надлежащей производственной практики).

Фармацевтические композиции включают пептиды как в свободной форме, так и в форме фармацевтически приемлемой соли (см. также выше). Используемое в контексте данного изобретения понятие «фармацевтически приемлемая соль» относится к производным раскрытых пептидов, причем пептид модифицирован путем получения кислых или основных солей вещества. Например, кислые соли получают из свободного основания (как правило, где нейтральная форма лекарственного средства имеет нейтральную группу –NH₂) с применением реакции

с подходящей кислотой. Подходящие кислоты для получения кислых солей включают как органические кислоты, например, уксусную кислоту, пропионовую кислоту, гликолевую кислоту, пировиноградную кислоту, щавелевую кислоту, яблочную кислоту, малоновую кислоту, янтарную кислоту, малеиновую кислоту, фумаровую кислоту, винную кислоту, лимонную кислоту, бензойную кислоту, коричную кислоту, миндальную кислоту, метансульфоновую кислоту, этансульфоновую кислоту, п-толуолсульфокислоту, салициловую кислоту и подобные, так и неорганические кислоты, например, соляную кислоту, бромистоводородную кислоту, серную кислоту, азотную кислоту, фосфорную кислоту и тому подобные. И наоборот, приготовление основных солей кислотных компонентов, которые могут присутствовать на пептиде, производится при использовании фармацевтически приемлемого основания, такого как гидроксид натрия, гидроксид калия, гидроксид аммония, гидроксид кальция, триметиламин и тому подобных.

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

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

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

В одном аспекте вакцина включает по меньшей мере один пептид, имеющий аминокислотную последовательность с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No 268, и по меньшей мере один дополнительный пептид, предпочтительно от двух до 50, более предпочтительно от двух до 25, еще более предпочтительно от двух до 20 и, наиболее предпочтительно, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать или восемнадцать пептидов. Пептид(ы) может(могут) быть получен(ы) из одного или более специфических ТАА и может(могут) связываться с молекулами MHC I класса.

В еще одном аспекте изобретения предлагается нуклеиновая кислота (например, полинуклеотид), кодирующая пептид или вариант пептида по изобретению. Полинуклеотид может быть, например, ДНК, кДНК, ПНК, РНК или их комбинациями, как одно-, так и/или двухнитевыми; природными или стабилизированными формами полинуклеотидов, такими как, например, полинуклеотиды с фосфоротиоатным остовом, и может содержать или не содержать интроны при условии, что полинуклеотид кодирует пептид. Разумеется, только пептиды, которые содержат встречающиеся в природе аминокислотные остатки, соединенные

встречающимися в природе пептидными связями, могут кодироваться полинуклеотидом. В другом аспекте изобретения предложен вектор экспрессии, способный экспрессировать полипептид в соответствии с изобретением.

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

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

В желаемом способе модификации ДНК, кодирующей полипептид по изобретению, используется полимеразная цепная реакция, как раскрыто в работе Saiki RK и соавт. (Saiki et al., 1988). Этот способ может быть использован для введения ДНК в подходящий вектор, например, при конструировании в подходящих сайтах рестрикции, или же он может быть использован для модификации ДНК другими пригодными путями, известными из уровня техники. Если используются вирусные векторы, то предпочтительными являются поксвирусные или аденовирусные векторы.

Затем ДНК (или в случае ретровирусных векторов РНК) может экспрессироваться в подходящем хозяине для получения полипептида, включающего пептид или вариант по изобретению. Таким образом, ДНК, кодирующая пептид или вариант по изобретению, может быть использована в соответствии с известными методиками, модифицированными соответствующим образом с учетом раскрытых в данном

описании идей, для конструирования вектора экспрессии, который затем используется для трансформации подходящей клетки-хозяина для экспрессии и получения полипептида по изобретению. Такие методики включают те, что раскрыты, например, в патентах США №№ 4 440 859, 4 530 901, 4 582 800, 4 677 063, 4 678 751, 4 704 362, 4 710 463, 4 757 006, 4 766 075 и 4 810 648.

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

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

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

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

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

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

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

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

Настоящее изобретение относится также к клетке-хозяину, трансформированной с помощью полинуклеотидной векторной конструкции по настоящему изобретению. Клетка-хозяин может быть как прокариотической, так и эукариотической. Бактериальные клетки могут быть, предпочтительно, прокариотическими клетками-хозяевами при некоторых условиях и обычно являются штаммом *E. coli*, таким как, например, *E. coli* штамма DH5, имеющимся в наличии в Bethesda Research

Laboratories Inc., Бетесда, Мэриленд, США, и RR1, имеющимся в наличии в Американской коллекции типовых культур («American Type Culture Collection» (ATCC), Роквил, Мэриленд, США (№ ATCC 31343). Предпочтительные эукариотические клетки-хозяева включают клетки дрожжей, насекомых и млекопитающих, предпочтительно клетки позвоночных, таких как линии фибробластных клеток и клеток толстой кишки таких видов как мышь, крыса, обезьяна или человек. Дрожжевые клетки-хозяева включают YPH499, YPH500 и YPH501, которые, как правило, имеются в наличии в Stratagene Cloning Systems, Ла Жоло, Калифорния 92037, США. Предпочтительные клетки-хозяева млекопитающих включают клетки яичника китайского хомяка (CHO), имеющиеся в наличии в ATCC как CCL61, эмбриональные клетки швейцарской мыши линии NIH/3T3, имеющиеся в наличии в ATCC как CRL 1658, клетки COS-1 из почек обезьяны, имеющиеся в наличии в ATCC как CRL 1650, и клетки 293, являющиеся эмбриональными клетками почек эмбрионов человека. Предпочтительными клетками насекомых являются клетки Sf9, которые могут трансфицироваться с помощью бакуловирусных векторов экспрессии. Обзор в отношении выбора подходящих клеток-хозяев для экспрессии представлен, например, в учебном пособии авторов Paulina Balbás и Argelia Lorence «Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols », часть первая, второе издание, ISBN 978-1-58829-262-9, и другой литературе, известной специалисту данной области.

Трансформация соответствующих клеток-хозяев с помощью ДНК-конструкции по настоящему изобретению производится при помощи хорошо известных способов, которые обычно зависят от типа используемого вектора. Относительно трансформации прокариотических клеток-хозяев см., например, работу Cohen и соавт. (Cohen et al., 1972) и (Green and Sambrook, 2012). Трансформация дрожжевых клеток описывается в работе Sherman и соавт. (Sherman et al., 1986). Также подходит метод Бигса (Beggs) (Beggs, 1978) . Что касается клеток позвоночных, то подходящие для трансфекции таких клеток реагенты, например, фосфат кальция и DEAE-декстран или липосомальные составы, имеются в наличии

в Stratagene Cloning Systems или Life Technologies Inc., Гейтерсберг, Мэриленд 20877, США. Электропорация также подходит для трансформации и/или трансфекции клеток и хорошо известна из уровня техники для трансформации дрожжевых клеток, бактериальных клеток, клеток насекомых и клеток позвоночных.

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

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

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

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

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

Полинуклеотид, применяемый в активной вакцинации, может быть по существу чистым или содержаться в подходящем векторе или системе доставки. Нуклеиновая кислота может быть ДНК, кДНК, ПНК, РНК или их комбинацией. Методы конструирования и введения такой нуклеиновой кислоты хорошо известны из уровня техники. Обзор представлен, например, в работе Teufel и соавт. (Teufel et al., 2005). Полинуклеотидные вакцины просто получить, однако механизм действия этих векторов по индуцированию иммунного ответа понятен не полностью. Подходящие векторы и системы доставки включают вирусные ДНК и/или РНК, такие как системы, которые основаны на аденовирусе, вирусе осповакцины, ретровирусах, вирусе герпеса, аденоассоциированном вирусе или гибридах, содержащих элементы более чем одного вируса. Невирусные системы доставки включают катионные липиды и катионные полимеры и хорошо известны из уровня техники в области доставки ДНК. Также может быть использована физическая доставка, такая как посредством «генного пистолета». Пептид или пептиды, кодируемые нуклеиновой кислотой, могут быть слитым белком, например, с эпитопом, который стимулирует Т-клетки против соответствующего

противоположного определяющего комплементарность участка CDR, как описывается выше.

Медикамент по изобретению может также включать один или более адъювантов. Адъюванты – это вещества, которые неспецифически усиливают или потенцируют иммунный ответ (например, иммунные ответы, опосредованные CD8-положительными Т-клетками или хелперными Т-клетками (TH) на антиген, и могут, таким образом, рассматриваться как полезные в медикаменте по настоящему изобретению. Подходящие адъюванты включают, но без ограничения, 1018 ISS, соли алюминия, AMPLIVAX®, AS15, BCG, CP-870 893, CpG7909, CyaA, dSLIM, флагеллин или лиганды TLR5, полученные из флагеллина, лиганд FLT3, ГМ-КСФ, IC30, IC31, имиквимод (ALDARA®), резимиквимод, ImuFact IMP321, интерлейкины, такие как ИЛ-2, ИЛ-13, ИЛ-21, интерферон-альфа или бета или их пегилированные производные, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, иммуностимулирующие комплексы ISCOM, JuvImmune®, LipoVac, MALP2, MF59, монофосфорил липид А, Монтанид IMS 1312, Монтанид ISA 206, Монтанид ISA 50V, Монтанид ISA-51, эмульсии «вода в масле» и «масло в воде», OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, векторную систему PepTel®, основанные на поли-(лактид когликолиде) [PLG] и декстрани микрочастицы, талактоферрин SRL172, виросомы и другие вирусоподобные частицы, YF-17D, VEGF trap, R848, бета-глюкан, Pam3Cys, стимулон Aquila QS21, который получают из сапонины, микобактериальные экстракты и синтетические имитаторы бактериальных клеточных стенок и другие запатентованные адъюванты, такие как Detox компании Ribi, Quil или Superfos. Предпочтительными адъювантами являются такие как адъювант Фрейнда или ГМ-КСФ. Несколько иммунологических адъювантов (например, MF59), специфических для дендритных клеток, и их получение были описаны ранее (Allison and Krummel, 1995). Также могут использоваться цитокины. Несколько цитокинов были непосредственно соотнесены с влиянием на миграцию дендритных клеток к лимфоидным тканям (например, TNF- α), ускоряя созревание дендритных клеток до эффективных, презентующих антиген Т-лимфоцитам, клеток (например, ГМ-КСФ, ИЛ-1 и ИЛ-4) (патент США № 5 849 589, специально включенный сюда в

полном объеме путем ссылки) и действуя как иммуноадъюванты (например, ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-23, ИЛ-7, ИФН-альфа, ИФН-бета).

Об иммуностимулирующих олигонуклеотидах CpG также сообщалось, что они усиливают эффекты адъювантов в составе вакцин. Не желая быть связанными соответствием какой-либо конкретной теории, авторы полагают, что CpG-олигонуклеотиды при активации врожденной (не приобретенной) иммунной системы действуют с помощью Toll-подобных рецепторов (TLR), в основном, TLR9. Вызванная CpG активация TLR9 усиливает антиген-специфичные гуморальные и клеточные ответы на широкий спектр антигенов, включая пептидные или белковые антигены, живые или убитые вирусы, вакцины из дендритных клеток, аутологичные клеточные вакцины и полисахаридные конъюгаты как в профилактических, так и терапевтических вакцинах. Более важно то, что улучшается созревание и дифференциация дендритных клеток, приводя к повышенной активации клеток типа TH1 и интенсивной выработке цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) даже при отсутствии помощи со стороны CD4 Т-клеток. Активация TH1, вызванная стимуляцией TLR9, сохраняется даже в присутствии вакцинных адъювантов, таких как квасцы или неполный адъювант Фрейнда (IFA), которые обычно способствуют активации TH2. CpG-олигонуклеотиды проявляют даже бóльшую адъювантную активность, если они входят в состав или вводятся в организм вместе с другими адъювантами или в таких составах как микрочастицы, наночастицы, липидные эмульсии или в подобных составах, которые в особенности необходимы для инициации сильного ответа, если антиген относительно слаб. Они также ускоряют иммунную реакцию и позволяют снизить дозы антигена приблизительно на два порядка в сравнении с ответами антитела на полную дозу вакцины без CpG, что наблюдалось в некоторых экспериментах (Krieg, 2006). В патенте США № 6 406 705 В1 описывается комбинированное применение CpG-олигонуклеотидов, адъювантов, не включающих нуклеиновые кислоты, и антигена для вызывания антиген-специфического иммунного ответа. Антагонистом CpG TLR9 является dSLIM (иммуномодулятор со структурой типа двуцепочечный стебель-петля) компании Mologen (Берлин, Германия), который является предпочтительным

компонентом фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Также могут быть использованы другие молекулы, связывающиеся с TLR, такие как TLR 7, TLR 8 и/или TLR 9, связывающиеся с РНК.

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

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

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

В предпочтительном варианте осуществления фармацевтической композиции в соответствии с изобретением адъювант выбран из группы, состоящей из колониестимулирующих факторов, таких как гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ, сарграмостим), циклофосфамид, имиквимод и резиквимод. В предпочтительном варианте осуществления фармацевтической композиции в соответствии с изобретением адъювантом является циклофосфамид, имиквимод или резиквимод. Еще более предпочтительными адъювантами являются монтанид IMS 1312, монтанид ISA 206, монтанид ISA 50V, монтанид ISA-51, поли-ICLC (Hiltonol®) и моноклональные антитела к CD40 или их комбинации.

Эта композиция используется для парентерального введения, такого как подкожное, внутрикожное, внутримышечное или для перорального введения. Для этого пептиды и – факультативно – другие молекулы растворяют или суспендируют в фармацевтически приемлемом, предпочтительно водном, носителе. Помимо того, композиция может содержать вспомогательные вещества, такие как буферы, связующие агенты, балластные вещества, разбавители, ароматизаторы, смазочные вещества и т.д. Пептиды могут быть также введены вместе с иммуностимулирующими агентами, такими как цитокины. Обширный список вспомогательных веществ, которые могут быть использованы в такой композиции, может быть взят, например, из работы A. Kibbe, «Handbook of Pharmaceutical Excipients» (Kibbe, 2000). Композиция может использоваться для предупреждения, профилактики и/или лечения аденоматозных или раковых заболеваний. Примеры фармацевтических композиций могут быть взяты, например, из EP2112253.

Важно понимать, что иммунный ответ, вызванный вакциной в соответствии с изобретением, направлен на раковые клетки на различных стадиях клеточного цикла и различных стадиях развития опухоли. Кроме того, атака направлена на различные сигнальные пути, ассоциированные с раковым заболеванием. Это является преимуществом в сравнении с вакцинами, направленными только на одну или немногие мишени, что может привести к тому, что опухоль легко приспособится

к такой атаке (ускользание опухоли). Кроме того, не все отдельные опухоли имеют одинаковые паттерны экспрессии антигенов. Поэтому комбинация нескольких опухолеассоциированных пептидов гарантирует, что на каждой отдельной опухоли имеются по меньшей мере некоторые из этих мишеней. Композиция разработана исходя из того, что, как ожидается, каждая опухоль экспрессирует несколько антигенов и охватывает несколько независимых сигнальных путей, необходимых для роста и сохранения опухоли. Таким образом, вакцина в виде «готовой к применению» может быть легко использована для более крупной популяции пациентов. Это означает, что предварительный отбор пациентов для лечения вакциной может быть ограничен HLA-типированием, не требуя никакого дополнительного анализа биомаркеров экспрессии антигена, однако при этом остается гарантия одновременного воздействия на несколько мишеней в виде индуцированного иммунного ответа, что важно для эффективности (Banchereau et al., 2001; Walter et al., 2012).

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

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

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

Каждый каркас может быть конъюгирован со второй активной молекулой, такой как, например, ИЛ-21, антитело к CD3 и антитело к CD28.

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

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

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

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

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

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

Могут быть отобраны аптамеры к сложным мишеням, таким как клетки и ткани и комплексы пептидов, включающих, предпочтительно состоящих из последовательности в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 268, в соответствии с представленным изобретением с молекулой МНС, используя метод cell-SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment* - систематическая эволюция лигандов при экспоненциальном обогащении).

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

Таким образом, в другом аспекте изобретения предложен способ получения рекомбинантного антитела, специфически связывающегося с главным комплексом гистосовместимости человека (МНС) I или II класса в комплексе с

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

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

Соответствующие способы получения таких антител и одноцепочечных главных комплексов гистосовместимости I класса, в равной степени как и другие инструменты для получения данных антител, раскрыты в патентных заявках WO 03/068201, WO 2004/084798, WO 01/72768, WO 03/070752 и в опубликованных работах (Cohen et al., 2003a; Cohen et al., 2003b; Denksberg et al., 2003), которые все в целях настоящего изобретения в явном виде включены во всей полноте путем ссылки.

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

Настоящее изобретение относится к пептиду, включающему последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 268 или их вариант, который по меньшей мере на 88% гомологичен (предпочтительно, если он идентичен) последовательности с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 268, или их варианту, который индуцирует перекрестную реакцию Т-клеток с указанным пептидом, где указанный пептид не является базовым полипептидом полной длины.

Настоящее изобретение далее относится к пептиду, включающему последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 268 или их вариант, который по меньшей мере на 88% гомологичен (предпочтительно, если он идентичен) SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 268, где указанный пептид или его вариант имеет общую длину от 8 до 100, предпочтительно от 8 до 30 и, наиболее предпочтительно, от 8 до 14 аминокислот.

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

Настоящее изобретение далее относится к пептидам в соответствии с изобретением, где пептид состоит или состоит по существу из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 268.

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

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

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

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

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

Настоящее изобретение далее относится к пептиду в соответствии с настоящим изобретением, к нуклеиновой кислоте в соответствии с настоящим изобретением или к вектору экспрессии в соответствии с настоящим изобретением для применения в медицине, в частности, в лечении колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы и почечно-клеточной карциномы.

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

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

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

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

Настоящее изобретение далее относится к способу в соответствии с изобретением, где антигенпрезентирующая клетка включает вектор экспрессии, способный экспрессировать указанный пептид, содержащий последовательность с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 268 или указанную вариантную аминокислотную последовательность.

Настоящее изобретение далее относится к активированным Т-клеткам, полученным способом в соответствии с настоящим изобретением, где указанные Т-клетки селективно распознают клетку, которая аберрантно экспрессирует полипептид, включающий аминокислотную последовательность в соответствии с настоящим изобретением.

Настоящее изобретение далее относится к способу уничтожения клеток-мишеней у пациента, чьи клетки-мишени аберрантно экспрессируют полипептид, включающий любую аминокислотную последовательность в соответствии с настоящим

изобретением, причем способ включает введение пациенту эффективного числа Т-клеток в соответствии с настоящим изобретением.

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

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

Настоящее изобретение далее относится к применению в соответствии с изобретением, где указанные раковые клетки являются клетками колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы и почечно-клеточной карциномы или клетками других солидных или гематологических опухолей, таких как хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз и острый миелоидный лейкоз, и других лимфоидных новообразований, например, таких как неходжкинская лимфома, пост-трансплантационные лимфопролиферативные заболевания (PTLD), а также других миелоидных новообразований, таких как первичный миелофиброз, эссенциальная тромбоцитемия, истинная полицитемия, а также других новообразований, таких как рак пищевода, немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, меланома, рак молочной железы, рак желчного пузыря и холангиокарцинома, рак мочевого пузыря, рак матки, плоскоклеточная карцинома головы и шеи, мезотелиома.

Настоящее изобретение далее относится к конкретным маркерным белкам и биомаркерам на основе пептидов в соответствии с настоящим изобретением, в контексте изобретения называемые «мишенями», которые могут быть использованы при постановке диагноза и/или составлении прогноза течения колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы и почечно-клеточной карциномы. Настоящее изобретение относится также к применению этих новых мишеней для лечения рака.

Понятие «антитело» или «антитела» используется в контексте данного изобретения в широком смысле и включает как поликлональные, так и моноклональные антитела. В дополнение к интактным или «полным» молекулам иммуноглобулина в понятие «антитела» включены также фрагменты (например, участки CDR, фрагменты Fv, Fab и Fc) или полимеры таких молекул иммуноглобулина и гуманизированные версии молекул иммуноглобулина, при условии, что они проявляют любое из желаемых свойств (например, специфически связываются с (поли)пептидным маркером колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы и почечно-клеточной карциномы, доставляют токсин к клетке колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы и почечно-клеточной карциномы, экспрессирующей раковый ген-маркер на повышенном уровне и/или ингибируют активность полипептидного маркера колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы и почечно-клеточной карциномы) в соответствии с изобретением.

Если возможно, антитела по изобретению могут быть куплены в коммерческих источниках. Антитела по изобретению могут быть также получены при использовании хорошо известных способов. Опытному специалисту будет понятно, что для получения антител по изобретению могут использоваться как полипептидные маркеры колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы и почечно-клеточной карциномы полной длины, так и

их фрагменты. Полипептид, необходимый для получения антитела по изобретению, может быть частично или полностью очищенным из природного источника или же может быть получен с использованием методики рекомбинантной ДНК.

Например, кДНК, кодирующая пептид в соответствии с настоящим изобретением, такой как пептид с последовательностью с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID No. 268, полипептид или вариант или его фрагмент может быть экспрессирована в прокариотических клетках (например, бактерий) или эукариотических клетках (например, клетках дрожжей, насекомых или млекопитающих), после чего рекомбинантный белок может быть очищен и использован в получении препарата моноклональных или поликлональных антител, которые специфически связываются с полипептидным маркером колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы и почечно-клеточной карциномы, использованным для получения антитела по изобретению.

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

терапевтического или диагностического применения *in vivo* исследуют в соответствии с известными методами клинического исследования.

Понятие «моноклональное антитело» в контексте настоящего изобретения обозначает антитело, полученное из, по существу, гомогенной популяции антител, т. е. отдельные антитела внутри популяции идентичны за исключением возможных естественных мутаций, которые могут быть представлены в небольших количествах. Моноклональные антитела в контексте настоящего изобретения специфически включают «химерные» антитела, в которых участок тяжелой и/или легкой цепи идентичен или гомологичен соответствующим последовательностям антител, полученных из конкретного вида или относящихся к конкретному классу или подклассу антител, в то время как остальная(ые) часть(и) цепи идентична(ы) или гомологична(ы) соответствующим последовательностям антител, полученных из другого вида или относящихся к другому классу или подклассу антител, в равной степени как и фрагментов таких антител, пока они проявляют желаемую антагонистическую активность (Патент США № 4 816 567, который включен в настоящее описание в полном объеме).

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

Моноклональные антитела могут быть также получены с помощью технологий рекомбинантных ДНК, таких как описываемые в патенте США № 4 816 567. ДНК, кодирующая моноклональные антитела по изобретению, может быть легко выделена и секвенирована с помощью стандартных методик (например, при

использовании олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи мышиных антител).

In vitro-методы также подходят для получения моновалентных антител. Расщепление антител для получения их фрагментов, в особенности Fab-фрагментов, может быть произведено при использовании стандартных методик, известных из уровня техники. К примеру, расщепление может производиться при использовании папаина. Примеры расщепления под воздействием папаина описываются в заявке WO 94/29348 и в патенте США № 4 342 566. Расщепление антител под воздействием папаина обычно приводит к двум идентичным фрагментам, связывающимся с антигеном и называемым Fab-фрагментами, каждый из которых имеет отдельный антиген-связывающий сайт и остаточный Fc-фрагмент. В результате обработки пепсином получается фрагмент F(ab')₂ и фрагмент pFc'.

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

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

Способы гуманизации нечеловеческих антител хорошо известны из уровня техники. В целом, гуманизированное антитело имеет один или более аминокислотный остаток, введенный в него из источника, не являющегося человеческим. Такие аминокислотные остатки нечеловеческого происхождения часто называются «импортированными» остатками, которые обычно берутся из «импортированного» переменного домена. Гуманизация может быть по существу произведена

посредством замены участков CDR или последовательностей CDR грызунов на соответствующие последовательности человеческого антитела. Соответственно, такие «гуманизированные» антитела являются химерными антителами (патент США № 4 816 567), где существенно меньшая часть, чем один интактный человеческий переменный домен была заменена соответствующей последовательностью видов, не являющихся человеком. На практике гуманизированные антитела являются обычно человеческими антителами, в которых некоторые остатки CDR и, возможно, остатки FR заменены на остатки аналогичных сайтов антител грызунов.

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

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

специалиста данной области будет очевидно, что определенные носители могут быть более предпочтительными в зависимости от, например, способа введения и концентрации вводимого антитела.

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

Эффективная дозировка и режим введения антител могут быть определены эмпирически, а принятие таковых решений под силу специалисту данной области. Специалистам данной области будет понятно, что дозировка антител, которые должны быть введены, будет варьироваться в зависимости от, например, субъекта, которому будет вводиться антитело, способа введения, конкретного типа используемого антитела и других вводимых медикаментов. Типичная суточная доза антител при монотерапии антителами может варьироваться от около 1 мкг/кг вплоть до 100 мг/кг массы тела или более в день, в зависимости от факторов, упоминаемых выше. После введения антитела, предпочтительно для лечения колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы и почечно-клеточной карциномы, эффективность терапевтического антитела может быть оценена различными способами, известными компетентному специалисту данной области. Например, размер, количество и/или распределение рака у субъекта, проходящего лечение, может контролироваться с помощью стандартных методов визуализации опухоли. Введенное в терапевтических целях антитело, которое блокирует рост опухоли, приводит к уменьшению размера и/или предотвращает развитие новых опухолей в сравнении с течением болезни, которое бы имело место без введения антитела, и является эффективным антителом для лечения рака.

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

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

Эти антитела или ТКР могут также применяться для диагностики *in vivo*. Как правило, антитело помечают радионуклеотидом (таким как ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^3H , ^{32}P или ^{35}S), так что опухоль может быть локализована с помощью

иммуноскинтиграфии. В одном варианте осуществления антитела или их фрагменты связываются с внеклеточными доменами двух или более мишеней белка, выбранного из группы, состоящей из указанных выше белков, при показателе аффинности (K_d) ниже чем 1×10 мкМ.

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

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

Предпочтительно, если с антигенпрезентирующей клеткой применяется достаточное количество антигена.

Предпочтительно, если в клетке млекопитающих не имеется пептидного транспортера TAP или имеется его пониженный уровень или пониженная функциональная активность. Подходящие клетки с дефицитом пептидного транспортера TAP, включают T2, RMA-S и клетки дрозодилы. TAP - это транспортер, связанный с процессингом антигена.

Линия человеческих клеток с недостаточностью T2, на которые загружаются пептиды, имеется в наличии в Американской коллекции типовых культур, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, США под каталожным номером CRL 1992; клеточная линия дрозодилы, линия Schneider 2 имеется в наличии в ATCC под каталожным номером CRL 19863; клеточная линия мыши RMA-S описывается в работе Ljunggren и соавт. (Ljunggren and Karre, 1985).

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

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

Если антигенпрезентирующая клетка трансфицирована для экспрессии такого эпитопа, то предпочтительно, чтобы клетка включала вектор экспрессии, способный экспрессировать пептид, содержащий SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 268 или вариант такой аминокислотной последовательности.

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

При получении Т-клеток могут быть также использованы аллогенные клетки, и этот способ подробно описывается в патентной заявке WO 97/26328, включенной сюда путем ссылки. Например, кроме клеток дрозифилы и Т2-клеток, для презентации антигенов могут использоваться другие клетки, такие как клетки яичника китайского хомяка (CHO), бакуловирус-инфицированные клетки насекомых, бактерии, дрожжи и инфицированные осповакциной клетки-мишени. Кроме того, могут быть

использованы растительные вирусы (см., например, работу Porta и соавт. (Porta et al., 1994), в которой описывается разработка мозаичного вируса китайской вигны как высокопродуктивной системы презентации чужеродных пептидов.

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

Активированные Т-клетки, полученные с помощью приведенного выше способа, будут селективно распознавать клетку, которая аберрантно экспрессирует полипептид, включающий аминокислотную последовательность с SEQ ID No. 1 по SEQ ID NO 268.

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

Клетками-мишенями *in vivo* для CD8-положительных Т-клеток в соответствии с настоящим изобретением могут быть клетки опухоли (которые иногда

экспрессируют молекулы МНС II класса) и/или стромальные клетки, окружающие опухоль (опухолевые клетки) (которые иногда также экспрессируют молекулы МНС II класса;; (Dengjel et al., 2006)).

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

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

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

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

Другой аспект настоящего изобретения включает применение пептидов в комплексе с МНС для получения Т-клеточного рецептора, нуклеиновая кислота которого клонирована и введена в клетку-хозяин, предпочтительно Т-клетку.

Данная сконструированная Т-клетка может быть затем введена пациенту для лечения рака.

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

В настоящем изобретении также предложен комплект, включающий:

- (а) контейнер, который содержит фармацевтическую композицию, как описанная выше, в виде раствора или в лиофилизированной форме;
- (б) факультативно – второй контейнер, содержащий разбавитель или восстанавливающий раствор для лиофилизированного состава; и
- (в) факультативно – инструкции по (i) применению раствора или (ii) восстановлению и/или по применению лиофилизированного состава.

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

Комплект согласно настоящему изобретению предпочтительно включает лиофилизированный состав по настоящему изобретению в подходящем контейнере и инструкции для его восстановления и/или по его применению. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, (например, двухкамерные флаконы), шприцы (такие как двухкамерные шприцы) и пробирки.

Контейнер может быть изготовлен из разных материалов, таких как стекло или пластмасса. Предпочтительно, если комплект и/или контейнер содержит(ат) инструкции по применению контейнера или связанные с ним инструкции, которые дают указания по восстановлению и/или применению. Например, на этикетке может быть указано, что лиофилизированный состав должен быть восстановлен до таких концентраций пептидов, как описано выше. На этикетке далее может быть указано, что состав применяется или предназначается для подкожного введения.

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

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

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

Комплект по изобретению предпочтительно включает состав по изобретению, упакованный для применения в комбинации с совместным введением второго соединения (такого как адъюванты (например, ГМ-КСФ), химиотерапевтического

средства, природного продукта, гормона или антагониста, средства против ангиогенеза или ингибитора ангиогенеза; апоптоз-индуцирующего средства или хелатора) или их фармацевтической композиции. Компоненты комплекта до введения пациенту могут быть предварительно смешаны, или же каждый компонент может находиться в отдельном контейнере. Компоненты комплекта могут быть предоставлены в виде одного или нескольких жидких растворов, предпочтительно, водного раствора, более предпочтительно, стерильного водного раствора. Компоненты комплекта также могут быть предоставлены в виде твердой формы, которая может быть превращена в жидкость при добавлении подходящих растворителей, которые, предпочтительно, предоставляются в другом, отдельном, контейнере.

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

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

Так как пептиды по изобретению были выделены из клеток колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы и почечно-клеточной карциномы, медикамент по изобретению предпочтительно используется для

лечения колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы и почечно-клеточной карциномы.

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

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

В контексте настоящего изобретения термин «хранилище» относится к группе или набору пептидов, которые предварительно прошли скрининг на иммуногенность и/или избыточную презентацию в конкретном виде опухоли. Понятие «хранилище» не подразумевает, что конкретные пептиды, включенные в вакцину, были изготовлены заблаговременно и хранились в реальном помещении, хотя эта возможность также принимается во внимание. Во внимание определено принимается тот факт, что пептиды могут быть изготовлены *de novo* для каждой производимой индивидуализированной вакцины, или могут быть получены заранее и находиться на хранении. Хранилище (например, в форме банка данных) состоит из опухолиассоциированных пептидов, которые в высокой степени избыточно экспрессировались в опухолевой ткани пациентов с колоректальным раком,

глиобластомой, раком желудка, гепатоклеточной карциномой и почечно-клеточной карциномой с различными HLA-A, HLA-B и HLA-C-аллелями. Оно может содержать пептиды, связанные с молекулами MHC I класса и MHC II класса или удлиненные пептиды, связанные с молекулами MHC I класса. Помимо опухолеассоциированных пептидов, собранных из нескольких тканей колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы и почечно-клеточной карциномы, хранилище может содержать маркерные пептиды, связанные с HLA-A*02, HLA-A*01, HLA-A*03, HLA-A*24, HLA-B*07, HLA-B*08 и HLA-B*44. Эти пептиды позволяют произвести количественное сравнение интенсивности Т-клеточного иммунного ответа, индуцированного пептидами TUMAP, и, следовательно, позволяют сделать важный вывод о способности вакцины вызывать противоопухолевые ответы. Во-вторых, они выполняют функцию важных пептидов положительного контроля, полученных «не из собственного» антигена в случае, если у пациента не наблюдаются вызванные вакциной Т-клеточные ответы на пептиды TUMAP, полученные из «собственных» антигенов. И в-третьих, оно может позволить сделать заключения относительно статуса иммунокомпетентности пациента.

Пептиды TUMAP для хранилища идентифицируются с помощью интегрированного подхода функциональной геномики, комбинирующего анализ экспрессии генов, масс-спектрометрию и Т-клеточную иммунологию (Xpresident®). Этот подход гарантирует, что только те пептиды TUMAP, которые действительно присутствуют в большом проценте опухолей, но не экспрессируются или экспрессируются лишь минимально на нормальной ткани, были выбраны для последующего анализа. В целях первоначального отбора пептидов образцы ткани колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы и почечно-клеточной карциномы пациентов и кровь здоровых доноров были проанализированы поэтапно:

1. HLA-лиганды из злокачественного материала идентифицировали с помощью масс-спектрометрии.
2. Для идентификации экспрессированных в избытке генов в злокачественной ткани (колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы и

почечно-клеточной карциномы) по сравнению с рядом нормальных органов и тканей применяли анализ экспрессии информационной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) всего генома.

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

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

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

6. В целях оценки того, может ли быть осуществима индукция *in vivo* Т-клеточных ответов выбранными пептидами, были проведены анализы иммуногенности *in vitro* при использовании человеческих Т-клеток здоровых доноров, а также пациентов, больных колоректальным раком, глиобластомой, раком желудка, гепатоклеточной карциномой и почечно-клеточной карциномой.

В одном из аспектов пептиды предварительно прошли скрининг на иммуногенность до их включения в хранилище. В качестве примера, но не для ограничения изобретения, иммуногенность пептидов, включенных в хранилище, определяется способом, включающим прайминг Т-клеток *in vitro* посредством повторных стимуляций CD8⁺ Т-клеток здоровых доноров клетками, презентирующими искусственный антиген, нагруженными комплексами пептид-МНС и антителами к CD28.

Этот способ является предпочтительным для редких видов рака и пациентов с редким профилем экспрессии. В отличие от мультипептидных коктейлей с постоянным составом, уже разработанных на данное время, «хранилище»

позволяет достигнуть существенно более высокого соответствия фактической экспрессии антигенов в опухоли составу вакцины. Выбранные «готовые к применению» отдельные пептиды или комбинации из нескольких пептидов будут использоваться для каждого пациента в рамках мультитаргетного подхода. Теоретически, подход, основанный на выборе, например, 5 различных антигенных пептидов из библиотеки из 50 экземпляров, уже приведет приблизительно к 17 миллионам возможных составов лекарственного препарата (ЛП).

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

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

Предпочтительно, чтобы пептиды, включенные в вакцину, были идентифицированы способом, включающим: (а) идентификацию опухолеассоциированных пептидов (TUMAP), презентуемых опухолевым образцом отдельного пациента; (б) сравнение идентифицированных на этапе (а) пептидов с хранилищем (банком данных) пептидов, как описано выше; и (в) выбор по меньшей мере одного пептида из хранилища (банка данных), который коррелирует с опухолеассоциированным пептидом, идентифицированным у пациента. Например, пептиды TUMAP, презентуемые опухолевым образцом, идентифицируют с помощью: (а1) сравнения данных по экспрессии в опухолевом образце с данными нормальной ткани, соответствующей типу ткани опухолевого образца, для идентификации белков, которые в опухолевом образце

экспрессируются в избытке или абберрантно; и (a2) установления корреляции между данными экспрессии и последовательностями лигандов МНС, связанных с молекулами МНС I и/или II класса в опухолевом образце, в целях идентификации лигандов МНС, которые получены из белков, избыточно или абберрантно экспрессируемых опухолью. Предпочтительно, если последовательности лигандов МНС идентифицируются с помощью элюирования связанных пептидов из молекул МНС, выделенных из опухолевого образца, и секвенирования элюированных лигандов. Предпочтительно, если опухолевый образец и нормальная ткань получены от одного и того же пациента.

Помимо этого, или в качестве альтернативы этому, при выборе пептидов с использованием модели хранилища (банка данных) пептиды TUMAP могут быть идентифицированы у пациента *de novo* и затем быть включены в вакцину. В качестве одного примера: пептиды-кандидаты TUMAP могут быть идентифицированы у пациента с помощью (a1) сравнения данных по экспрессии в опухолевом образце с данными нормальной ткани, соответствующей типу ткани опухолевого образца, для идентификации белков, которые в опухолевом образце экспрессируются в избытке или абберрантно; и (a2) установления корреляции между данными экспрессии и последовательностями лигандов МНС, связанных с молекулами МНС I и/или II класса в опухолевом образце, в целях идентификации лигандов МНС, которые получены из белков, избыточно или абберрантно экспрессируемых опухолью. В качестве другого примера: могут быть идентифицированы белки, имеющие мутации, являющиеся уникальными для опухолевого образца, соотносимого с соответствующей нормальной тканью отдельного пациента, и могут быть идентифицированы пептиды TUMAP, специфической мишенью которых является мутация. Например, геном опухоли и соответствующей нормальной ткани могут быть секвенированы методом полногеномного секвенирования: для обнаружения несинонимичных мутаций на кодирующих белок участках генов геномную ДНК и РНК экстрагируют из опухолевых тканей, а нормальную, не имеющую мутаций геномную ДНК зародышевой линии экстрагируют из мононуклеарных клеток периферической крови (МПК).

Применяемый подход секвенирования нового поколения (NGS) заключается в повторном секвенировании кодирующих белок участков (повторное секвенирование экзона). В этих целях экзонную ДНК из человеческих образцов фиксируют с помощью поставляемых изготовителем наборов для обогащения целевыми фрагментами, за чем следует секвенирование, например, с помощью системы HiSeq2000 (Illumina). В дополнение к этому опухолевую мРНК секвенируют для прямого количественного определения генной экспрессии и подтверждения того, что мутировавшие гены экспрессированы в опухолях пациентов. Считывание полученных в результате миллионов последовательностей осуществляется алгоритмами программного обеспечения. Получаемый список содержит мутации и экспрессию генов. Опухолеспецифические соматические мутации определяют сравнением с вариантами зародышевой линии из МПК и устанавливают приоритетность. Идентифицированные *de novo* пептиды могут быть затем испытаны на иммуногенность, как описывается выше в случае хранилища, и пептиды-кандидаты TUMAP, обладающие подходящей иммуногенностью, выбирают для включения в вакцину.

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

В отдельном варианте осуществления изобретения пептиды, включенные в вакцину, идентифицируют с помощью: (а) идентификации

опухолеассоциированных пептидов (TUMAP), презентуемых опухолевым образцом отдельного пациента; и (б) выбора по меньшей мере одного пептида, идентифицированного *de novo* на этапе (а) и подтверждения его иммуногенности.

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

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

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

Кроме того, пептиды по настоящему изобретению пригодны не только для лечения рака, но и также в качестве диагностических средств. Так как пептиды были получены из клеток колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы и почечно-клеточной карциномы, и так как было определено, что данные пептиды не присутствуют или присутствуют в небольшом количестве в нормальных тканях, то эти пептиды могут быть использованы для диагностики наличия рака.

Присутствие заявленных пептидов на тканевых биоптатах и в образцах крови может помочь патоморфологу в постановке диагноза рака. Выявление конкретных пептидов с помощью антител, масс-спектрометрии или других методов, известных из уровня техники, могут дать патоморфологу свидетельства того, что образец ткани является злокачественной или воспаленной или пораженной заболеванием вообще, или же может использоваться в качестве биомаркера колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы и почечно-клеточной карциномы. Присутствие групп пептидов может позволить классифицировать или выделить подклассы пораженных тканей.

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

Пептиды по настоящему изобретению могут использоваться в анализе ответов лимфоцитов на действие этих пептидов, таких как Т-клеточные ответы или ответы в виде антител к пептиду или пептиду в комплексе с молекулами МНС. Данные ответы лимфоцитов могут использоваться в качестве прогностических маркеров для принятия решения о дальнейших этапах терапии. Данные ответы могут также использоваться в качестве суррогатных маркеров ответов в иммунотерапевтических подходах, направленных на индуцирование ответов лимфоцитов с помощью различных средств, например, вакцинации белком, нуклеиновыми кислотами, аутологичными материалами, адоптивным переносом лимфоцитов. В условиях, когда проводится генная терапия, в целях оценки побочных эффектов могут быть проанализированы ответы лимфоцитов на

пептиды. Мониторинг реакций лимфоцитов может также быть ценным инструментом для обследований в рамках последующего наблюдения после трансплантации, к примеру, для выявления реакций «хозяин против трансплантата» и «трансплантат против хозяина».

Настоящее изобретение будет описано ниже с помощью примеров, которые описывают его предпочтительные варианты осуществления, со ссылкой на сопровождающие фигуры, тем не менее, не ограничивая объема изобретения. В соответствии с целями настоящего изобретения все цитируемые источники включены в данное описание во всей полноте путем ссылки.

ФИГУРЫ

На Фигурах 1А – 1Р представлены примеры профилей экспрессии исходных генов настоящего изобретения, которые экспрессированы в избытке в различных раковых образцах. Опухолевые (черные точки) и нормальные (серые точки) образцы сгруппированы по органам происхождения, а на диаграммах размаха («ящик с усами») представлены медиана, 25-ый и 75-ый процентиля (ящик) и минимум и максимум (усы) значений RPKM. Нормальные органы расположены в соответствии с категориями риска. RPKM = число ридов на тысячу пар нуклеотидов, отнесенное на миллион картированных ридов. Нормальные образцы: клетки крови; кровен. сосуды: кровеносные сосуды; головной мозг; сердце; печень; легкое; жировая ткань; надпочечник; желчн. прот.: желчные протоки; мочев. п.: мочевого пузыря; КМ: костный мозг; хрящевая ткань; пищевод; глаз; желчн. п.: желчный пузырь; голова и шея; почка; толст. киш.: толстая кишка; ЛУ: лимфатический узел; нерв; подж. железа: поджелудочная железа; парацист.: парацистовидная железа; брюшина; гипофиз; скел. мышца: скелетная мышца; кожа; тонк. киш.: тонкая кишка; селезенка; желудок; щитов. жел.: щитовидная железа; трахея; мочеточник; молочн. жел.: молочная железа; яичник; плацента; предст. жел.: предстательная железа; семенник; вилочк. жел.: вилочковая железа; матка. Опухолевые образцы: КРК: колоректальный рак; ГБМ: глиобластома; РЖ: рак желудка; ГЖК: гепатоклеточная карцинома; ПКЖ: почечно-клеточная карцинома. Фигура 1А) символ гена: EGFR,

пептид: LPSPTDSNFY (SEQ ID No. 2), Фигура 1B) символ гена: PTPRZ1, пептид: LTDYINANY (SEQ ID No. 28), 1C) символ гена: CCDC146, пептид: KMMALVAEL (SEQ ID No. 42), 1D) символ гена: MMP16, пептид: YLPPTDPRMSV (SEQ ID No. 54), 1E) символ гена: RP11-1220K2.2, пептид: GLPDFVKEL (SEQ ID No. 60), 1F) символ гена: GRM8, пептид: ATMQSKLIQK (SEQ ID No. 99), 1G) символ гена: HAVCR1, пептид: GVIIAKKYFFK (SEQ ID No. 101), 1H) символ гена: SEMA5B, пептид: GTESGTILK (SEQ ID No. 110), 1I) символ гена: PIWIL1, пептид: SFDSNLLSF (SEQ ID No. 133), 1J) символ гена: UGT1A3, пептид: KYLSIPTVF (SEQ ID No. 138), 1K) символ гена: FEZF1, пептид: APAAVPSAPA (SEQ ID No. 153), 1L) символ гена: MMP11, пептид: RPASSLRP (SEQ ID No. 163), 1M) символ гена: QRFPR, пептид: SPMWHVQQL (SEQ ID No. 170), 1N) символ гена: REG4, пептид: SRSMRLLLL (SEQ ID No. 190), 1O) символ гена: PTHLH, пептид: AEIHTAEI (SEQ ID No. 231), 1P) символ гена: EGFR, пептид: DEYLIPQQGF (SEQ ID No. 264).

На Фигуре 2 представлены типичные результаты пептид-специфических ответов *in vitro* CD8⁺ Т-клеток здорового HLA-A*02⁺ донора. CD8⁺ Т-клетки примировали с помощью искусственных АПК, стимулированных моноклональными антителами к CD28 и HLA-A*02 в комплексе с пептидом с последовательностью SeqID No. 267 (KTLGKLWRL, Seq ID No. 267) (А, левая секция. После трех циклов стимуляции обнаружение клеток, реагирующих с пептидом, производилось с помощью двойного окрашивания мультимерами A*02/SeqID No 267 (А). Правая секция (В) представляет собой контрольное окрашивание клеток, простимулированных нерелевантными комплексами пептида и A*02. Из числа отдельных жизнеспособных клеток путем гейтирования выделяли CD8⁺ лимфоциты. Гейты Буля помогали исключить ложно-положительные ответы, обнаруженные с помощью мультимеров, специфических в отношении различных пептидов. Указывается частота выявления специфических мультимер-положительных клеток среди CD8⁺ лимфоцитов.

На Фигуре 3 представлены типичные результаты ответов *in vitro* пептид-специфических CD8⁺ Т-клеток здорового HLA-A*24⁺ донора. CD8⁺ Т-клетки

примировали с помощью искусственных АПК, стимулированных моноклональными антителами к CD28 и HLA-A*24 в комплексе с пептидом с последовательностью SEQ ID No. 268 (А, левая секция). После трех циклов стимуляции обнаружение клеток, реагирующих с пептидом, производилось с помощью двойного окрашивания мультимерами A*24/SEQ ID No. 268 (DYIPYVFKL, SEQ ID No. 268) (А). Правая секция (В) представляет собой контрольное окрашивание клеток, простимулированных нерелевантными комплексами пептида и A*24. Из числа отдельных жизнеспособных клеток путем гейтирования выделяли CD8+ лимфоциты. Гейты Буля помогали исключить ложно-положительные ответы, обнаруженные с помощью мультимеров, специфических в отношении различных пептидов. Указывается частота выявления специфических мультимер-положительных клеток среди CD8+ лимфоцитов.

На Фигуре 4 представлены типичные результаты ответов *in vitro* пептид-специфических CD8+ Т-клеток здорового HLA-A*01+ донора. CD8+ Т-клетки примировали с помощью искусственных АПК, стимулированных моноклональными антителами к CD28 и HLA-A*01 в комплексе с пептидом с последовательностью SEQ ID No. 6 (VLDLSTNVY; А, левая секция) и с пептидом с последовательностью SEQ ID No. 245 (ITEKNSGLY; В, левая секция), соответственно. После трех циклов стимуляции обнаружение клеток, реагирующих с пептидом, производилось с помощью двойного окрашивания мультимерами A*01/ SEQ ID No. 6 (А) или A*01/ SEQ ID No. 245 (В). Правые секции (А и В) представляют собой контрольное окрашивание клеток, простимулированных нерелевантными комплексами пептида и A*01. Из числа отдельных жизнеспособных клеток путем гейтирования выделяли CD8+ лимфоциты. Гейты Буля помогали исключить ложно-положительные ответы, обнаруженные с помощью мультимеров, специфических в отношении различных пептидов. Указывается частота выявления специфических мультимер-положительных клеток среди CD8+ лимфоцитов.

На Фигуре 5 представлены типичные результаты пептид-специфических ответов *in vitro* CD8+ Т-клеток здорового HLA-A*02+ донора. CD8+ Т-клетки примировали с

помощью искусственных АПК, стимулированных моноклональными антителами к CD28 и HLA-A*02 в комплексе с пептидом с последовательностью SEQ ID No. 42 (KMMALVAEL; A, левая секция) и пептидом с последовательностью SEQ ID No. 250 (KMILKMOVQL; B, левая секция), соответственно. После трех циклов стимуляции обнаружение клеток, реагирующих с пептидом, производилось с помощью двойного окрашивания мультимерами A*02/SEQ ID No. 42 (A) или A*02/ SEQ ID No. 250 (B). Правые секции (A и B) представляют собой контрольное окрашивание клеток, простимулированных нерелевантными комплексами пептида и A*02. Из числа отдельных жизнеспособных клеток путем гейтирования выделяли CD8+ лимфоциты. Гейты Буля помогали исключить ложно-положительные ответы, обнаруженные с помощью мультимеров, специфических в отношении различных пептидов. Указывается частота выявления специфических мультимер-положительных клеток среди CD8+ лимфоцитов.

На Фигуре 6 представлены типичные результаты ответов *in vitro* пептид-специфических CD8+ Т-клеток здорового HLA-A*03+ донора. CD8+ Т-клетки примировали с помощью искусственных АПК, стимулированных моноклональными антителами к CD28 и HLA-A*03 в комплексе с пептидом с последовательностью SEQ ID No. 94 (KTYVGHPVKM; A, левая секция) и пептидом с последовательностью SEQ ID No. 110 (GTESGTILK; B, левая секция), соответственно. После трех циклов стимуляции обнаружение клеток, реагирующих с пептидом, производилось с помощью двойного окрашивания мультимерами A*03/ SEQ ID No. 94 (A) или A*03/ SEQ ID No. 110 (B). Правые секции (A и B) представляют собой контрольное окрашивание клеток, простимулированных нерелевантными комплексами пептида и A*03. Из числа отдельных жизнеспособных клеток путем гейтирования выделяли CD8+ лимфоциты. Гейты Буля помогали исключить ложно-положительные ответы, обнаруженные с помощью мультимеров, специфических в отношении различных пептидов. Указывается частота выявления специфических мультимер-положительных клеток среди CD8+ лимфоцитов.

На Фигуре 7 представлены типичные результаты ответов *in vitro* пептид-специфических CD8⁺ Т-клеток здорового HLA-A*24⁺ донора. CD8⁺ Т-клетки примировали с помощью искусственных АПК, стимулированных моноклональными антителами к CD28 и HLA-A*24 в комплексе с пептидом с последовательностью SEQ ID No. 138 (KYLSIPTVF; левая секция). После трех циклов стимуляции обнаружение клеток, реагирующих с пептидом, производилось с помощью двойного окрашивания мультимерами A*02/ SEQ ID No. 138. Правая секция представляет собой контрольное окрашивание клеток, простимулированных нерелевантными комплексами пептида и A*24. Из числа отдельных жизнеспособных клеток путем гейтирования выделяли CD8⁺ лимфоциты. Гейты Буля помогали исключить ложноположительные ответы, обнаруженные с помощью мультимеров, специфических в отношении различных пептидов. Указывается частота выявления специфических мультимер-положительных клеток среди CD8⁺ лимфоцитов.

На Фигуре 8 представлены типичные результаты ответов *in vitro* пептид-специфических CD8⁺ Т-клеток здорового HLA-B*07⁺ донора. CD8⁺ Т-клетки примировали с помощью искусственных АПК, стимулированных моноклональными антителами к CD28 и HLA-A*07 в комплексе с пептидом с последовательностью SEQ ID No. 170 (SPMWHVQQL; А, левая секция) и пептидом с последовательностью SEQ ID No. 155 (FPYPYAERL; В, левая секция), соответственно. После трех циклов стимуляции обнаружение клеток, реагирующих с пептидом, производилось с помощью двойного окрашивания мультимерами B*07/ SEQ ID No. 170 (А) или B*07/ SEQ ID No. 155 (В). Правые секции (А и В) представляют собой контрольное окрашивание клеток, простимулированных нерелевантными комплексами пептида и B*07. Из числа отдельных жизнеспособных клеток путем гейтирования выделяли CD8⁺ лимфоциты. Гейты Буля помогали исключить ложноположительные ответы, обнаруженные с помощью мультимеров, специфических в отношении различных пептидов. Указывается частота выявления специфических мультимер-положительных клеток среди CD8⁺ лимфоцитов.

На Фигуре 9 представлены типичные результаты ответов *in vitro* пептид-специфических CD8+ Т-клеток здорового HLA-B*44+ донора. CD8+ Т-клетки примировали с помощью искусственных АПК, стимулированных моноклональными антителами к CD28 и HLA-B*44 в комплексе с пептидом с последовательностью SEQ ID No. 225 (SEAFPSRAL; A, левая секция) и пептидом с последовательностью SEQ ID No. 236 (EEKLIQDF; B, левая секция), соответственно. После трех циклов стимуляции обнаружение клеток, реагирующих с пептидом, производилось с помощью двойного окрашивания мультимерами B*44/ SEQ ID No. 225 (A) или B*44/ SEQ ID No. 236 (B). Правые секции (A и B) представляют собой контрольное окрашивание клеток, простимулированных нерелевантными комплексами пептида и B*44. Из числа отдельных жизнеспособных клеток путем гейтирования выделяли CD8+ лимфоциты. Гейты Буля помогали исключить ложно-положительные ответы, обнаруженные с помощью мультимеров, специфических в отношении различных пептидов. Указывается частота выявления специфических мультимер-положительных клеток среди CD8+ лимфоцитов.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1:

Идентификации опухолеассоциированных пептидов, презентируемых на поверхности клетки

Образцы тканей

Опухолевые ткани пациентов и нормальные ткани были получены из Университетской клиники г. Тюбинген (Тюбинген, Германия). Перед проведением хирургической операции или аутопсии было получено информированное согласие всех пациентов в письменной форме. Сразу же после удаления ткани были подвергнуты шоковой заморозке и хранились до выделения TUMAP-пептидов при температуре -70°C или ниже. Количество выбранных образцов для пептидов TUMAP: для рака почки N = 79, для колоректального рака N = 35, для гепатоклеточной карциномы N = 22, для рака желудка N = 10 и для глиобластомы N = 12.

Выделение пептидов HLA из образцов тканей

Пулы пептидов HLA из подвергнутых шоковой заморозке образцов тканей были получены методом иммунопреципитации из плотных тканей в соответствии с незначительно измененным протоколом (Falk et al., 1991; Seeger et al., 1999) при использовании HLA-A*02-специфического антитела BB7.2, HLA-A, -B, -C-специфического антитела W6/32, HLA-DR-специфического антитела L243 и специфического ко всему II классу молекул HLA антителу Tü39, CNBr-активированной сефарозы, кислотной обработки и ультрафильтрации.

Масс-спектрометрический анализ

Полученные пулы пептидов HLA были разделены в соответствии с их гидрофобностью обратнофазовой хроматографией (Ultimate 3000 RSLC Nano UHPLC System, Dionex), и элюированные пептиды анализировали на гибридных масс-спектрометрах LTQ-Orbitrap i Fusion Lumos (ThermoElectron), снабженных источником ESI. Образцы пептидов загружали с 3% растворителя В (20% H₂O, 80% ацетонитрила и 0,04% муравьиной кислоты) в 2 см-колодку PerMap 100 C18 Nanotrap (Dionex) при скорости потока 4 мкл/мин в течение 10 мин. Разделение производили на 25 см- или 50 см-колонке PerMap C18 с размером частиц 2 мкм (Dionex), размещенной в термостате колонки с установленной температурой 50°C. Применявшийся градиент находился в диапазоне от 3 до 32% растворителя В в течение 90 мин при скорости потока 300 нл/мин (для 25 см-колонок) или в течение 140 мин при скорости потока 175 нл/мин (для 50 см-колонок). (Растворитель А: 99% H₂O, 1% АЦН и 0,1% муравьиной кислоты; растворитель В: 20% H₂O, 80% АЦН и 0,1% муравьиной кислоты).

Масс-спектрометрический анализ проводили в режиме зависимого от данных анализа при использовании метода первой пятерки (т. е. во время каждого обзорного скана для фрагментации выбирались пять наиболее распространенных ионов-предшественников). Альтернативно, для анализа на приборах Fusion Lumos использовали метод TopSpeed.

Обзорные сканы записывали на Orbitrap с разрешением 60 000 (для Orbitrap XL) или 120 000 (для Orbitrap Fusion Lumos). Анализ MS-MS проводили методом диссоциации, индуцированной столкновением (CID, нормализованная энергия столкновения 35%, время активации 30 мс, ширина изоляции масс 1,3 m/z), с последующим анализом с линейной квадрупольной ионной ловушкой (LTQ). Диапазон значений масс лигандов молекул HLA I класса был ограничен 400–650 m/z с возможным состоянием заряда 2+ и 3+, выбранным для фрагментации. Для молекул HLA II класса диапазон масс был установлен в пределах 300–1500 m/z, позволяя проводить фрагментацию с состояниями положительного заряда ≥ 2 .

Тандемные масс-спектры были интерпретированы с помощью программ MASCOT или SEQUEST с фиксированным уровнем ложноположительных обнаружений ($q \leq 0,05$) и дополнительным контролем в ручном режиме. В случае, если идентифицированная последовательность пептида была неопределенной, ее дополнительно подтверждали сравнением полученной картины фрагментации природного пептида с картиной фрагментации синтетического контрольного пептида с идентичной последовательностью.

В Таблице 8а и 8б показана презентация выбранных пептидов при различных раковых заболеваниях и, таким образом, конкретная значимость упомянутых пептидов для диагностики и/или лечения указанных раковых заболеваний (например, пептида с последовательностью SEQ ID No. 1 – для колоректального рака (Таблица 8а) и рака желчного пузыря и рака желудка (Таблица 8б), пептида с последовательностью SEQ ID No. 50 для колоректального рака и гепатоклеточной карциномы (Таблица 8а) и для ХГК, ГБМ, ПлККПШ, НХЛ, НМРЛплоск, РПЖ, МРЛ и КМП (Таблица 8б)).

Таблица 8а: Сводка данных презентации выбранных опухолеассоциированных пептидов по настоящему изобретению среди отдельных и предпочтительных видов рака (заболеваний).

ГБМ = глиобластома, КРК = колоректальный рак, ПКК = почечно-клеточная карцинома, ГЖК = гепатоклеточная карцинома, РЖ = рак желудка.

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептидов при раковых заболеваниях
1	RSDPVTLDV	CRC
2	LPSPTDSNFY	RCC
3	ASSTDSASY	HCC
4	NSDLKYNAL	HCC
5	SILGSDVRVPSY	HCC
6	VLDLSTNVY	HCC
7	LITGDPKAAVDY	CRC
8	TPVTEFSLNTY	CRC
9	FITAQNHGY	HCC
10	ITAQNHGY	HCC
11	LSAGSGPGQY	HCC
12	ITFGERFEY	RCC
13	GSTMVEHNY	RCC
14	YTERDGSAMVY	GBM
15	LTDYLKNTY	HCC
16	LSLIDRLVLY	RCC
17	YTDKLQHY	CRC
18	EVSNGKWLLY	RCC
19	VSNGKWLLY	RCC
20	STDEITTRY	HCC
21	STDIGALMY	CRC
22	TLEQVQLYY	CRC
23	TASEDVFQY	CRC
24	YTHHLFIFY	CRC
25	LMKEVMEHY	RCC
26	EVLDSHIHAY	GBM
27	LDSHIHAY	GBM
28	LTDYINANY	GBM
29	SVTDLEMPHY	GBM
30	VLDSDHIHAY	GBM
31	VTDLEMPHY	GBM
32	ATVGYFIFY	RCC
33	FADKIHLAY	RCC
34	ITDFNNIRY	CRC
35	FASDLLHLY	HCC
36	YAAYIIHAY	RCC
37	LTDSFPLKV	HCC
38	VMLNSNVLL	GBM
39	YLLPSVVLL	GBM

40	KIDDIWNLEV	HCC
41	SLQDTKITL	HCC
42	KMMALVAEL	RCC
43	GLMTIVTSL	CRC
44	SQTGFVVLV	GBM
45	KLLDEVTYL	RCC
46	VLITGLPLI	RCC
47	YQDSWFQQL	RCC
48	NLTFIIILI	HCC
49	NLASRPYSL	HCC
50	ELMPRVYTL	CRC, HCC
51	ALAAELNQL	GBM
52	YVSSGEMMV	GBM
53	LLMTSLTES	GBM
54	YLPPTDPRMSV	GBM
55	RLWQIQHHL	RCC
56	FLNQIYTQL	GC
57	GLTGVIMTI	CRC
58	MLCLLLTL	RCC
59	KLHEIYIQA	GBM
60	GLPDFVKEL	GC
61	RLFGLFLNNV	RCC
62	GSYSALLAKK	HCC
63	KVLGPNGLLK	HCC
64	STTKLYLAK	HCC
65	VLGPNGLLK	HCC
66	ATYEGIQKK	HCC
67	ATALSLSNK	HCC
68	ATAYGSTVSK	HCC
69	ATAYGSTVSKR	HCC
70	ATWSASLKNK	HCC
71	KLGNPNVSK	HCC
72	KQVFPGLNY	HCC
73	KSFDRHF EK	HCC
74	QLYSKFLLK	HCC
75	QVPTFTIPK	HCC
76	SAFGYVFPK	HCC
77	SSASLAHMK	HCC
78	STKSTSPPK	HCC
79	STNNEGNLK	HCC
80	STSHHLVSR	HCC

81	SVKLQGTSK	HCC
82	TAYGSTVSK	HCC
83	TAYGSTVSKR	HCC
84	TVASLHTEK	HCC
85	KMAAWPFSR	HCC
86	KTPSGALHRK	HCC
87	SSYSRSSAVK	GBM
88	MLLQQPLIY	RCC
89	KITDFGLAK	RCC
90	GSRLGKYYVK	RCC
91	SLIDRLVLY	RCC
92	AVLDLGSLAK	RCC
93	ALDKPGKSK	GBM
94	KTYVGHPVKM	RCC
95	RLFESSFHY	RCC
96	FSLAGALNAGFK	GBM
97	RMPPPLPTR	GBM
98	KLYPTYSTK	HCC
99	ATMQSKLIQK	RCC
100	ALLGVIIAK	RCC
101	GVIIAKKYFFK	RCC
102	IIAKKYFFK	RCC
103	KSWTASSSY	RCC
104	STQDTLLIK	CRC
105	GSAALYLLR	RCC
106	RLSPNDQYK	RCC
107	EIYGGHHAGF	GBM
108	LLKSSVGNFY	GBM
109	KIIAPLVTR	RCC
110	GTESGTILK	RCC
111	KIKEHVRSK	HCC
112	KMMADYGIRK	HCC
113	VWAKILSAF	HCC
114	KFLDSNIKF	HCC
115	YFEEAANFL	HCC
116	LVLDYSKDYNHW	HCC
117	NFLPPIARF	RCC
118	TYISKTIAL	RCC
119	YMKALGVGF	RCC
120	MYAKEFDLL	HCC
121	SYIEKVRFL	GBM

122	KLYGMPTDFGF	GC
123	RQYLAINQI	HCC
124	EVYSPEADQW	GBM
125	IYGPKYIHPSF	GC
126	TFQDKTLNF	CRC
127	IFINLSPEF	GC
128	SYTKVEARL	GC
129	VFLNQIYTQL	GC
130	VYGDGHYLTf	GC
131	KQLDHNLTf	CRC
132	VYNPVIYVF	HCC
133	SFDSNLLSF	CRC
134	TYLTGRQF	CRC
135	VIAPIISNF	CRC
136	EYNNIQHLF	RCC
137	KYLSLSNSF	RCC
138	KYLSIPTVF	HCC
139	PYASLASELF	HCC
140	KYLSIPAVF	HCC
141	KYLSIPAVFF	HCC
142	SSFPGAGNTW	GBM
143	FELPTGAGLQL	HCC
144	IPEPSAQQf	HCC
145	RVPSYTLIL	HCC
146	SPGDKRLAA	HCC
147	SPIKVPLLL	HCC
148	VPDGVSKVL	HCC
149	YPLTGDTRL	HCC
150	KPSSKALGTSL	CRC
151	VVHPRTLlL	RCC
152	IPSRLlAIL	RCC
153	APAAVPSAPA	GBM
154	GPGTRLSL	GBM
155	FPYPYAERL	CRC
156	HPQVVILSL	RCC
157	SPSPGKDPTL	RCC
158	VPERGEPEL	RCC
159	FPAHPSLlL	RCC
160	RPAPADSAL	RCC
161	NPYEGRVEV	RCC
162	MPMISIPRV	RCC

163	RPASSLRP	CRC, HCC
164	ISTPSEVSTPL	GC
165	TPIAKVSEL	CRC
166	HDPDVGSNSL	GBM
167	YPSEVEHMF	RCC
168	IPTDKLLVI	RCC
169	FPTEVTPHAF	GBM
170	SPMWHVQQL	RCC
171	APKLFAVAF	RCC
172	KPAHYPLIAL	RCC
173	MVPSAGQLALF	RCC
174	VPSLQRLML	RCC
175	HPIETLVDIF	RCC
176	AAMSRYEL	HCC
177	DLKYNALDL	HCC
178	HAKEKLTAL	HCC
179	IQIYKKLRTSSF	HCC
180	LLKAEPLAF	HCC
181	YKKLRTSSF	HCC
182	LPFLRENDL	GBM
183	FQKLKLLSL	CRC
184	EPVKKSRL	RCC
185	NPNLKTLL	GBM
186	SLIDRLVL	RCC
187	YVKERSKAM	RCC
188	SALDHVTRL	RCC
189	HIFLRTTL	HCC
190	SRSMLLLLL	GC
191	LINLKYLSL	RCC
192	LPMLKVLNL	RCC
193	LSYNKYLQL	RCC
194	EAKRHLLQV	HCC
195	AEAVLCTLQEL	HCC
196	AEQTGTWKL	HCC
197	EEAKQVLFL	HCC
198	FELPTGAGL	HCC
199	GEATLQRIY	HCC
200	GEELGFASL	HCC
201	GEHTSKATL	HCC
202	KEFNLQNMGL	HCC
203	KENFAGEATL	HCC

204	KESQLPTVM	HCC
205	QEVLLQTFL	HCC
206	SEPINIIDAL	HCC
207	TEATMTFKY	HCC
208	AEHDAVRNAL	CRC
209	YEVDTVLRV	GBM
210	SENIVIQVY	HCC
211	TEKEMIQKL	RCC
212	AEETCAPSV	RCC
213	TTMDQKSLW	GBM
214	AEQPDGLIL	HCC
215	AFITAQNHGY	HCC
216	LQEEKVPAIY	HCC
217	NEINEKIAPSF	HCC
218	AEGGKVPIKW	GBM, RCC
219	AENAEYLRV	GBM
220	KEITGFLLI	GBM
221	AEERAEAKKKF	RCC
222	NEISTFHNL	HCC
223	SEVPVARVW	HCC
224	SESAVFHGF	RCC
225	SEAFPSRAL	RCC
226	EELLHGQLF	GC
227	TEHTQSQAAW	RCC
228	AEKQTPDGRKY	GBM
229	KESDGFHRF	RCC
230	AENLFRAFL	CRC
231	AEIHTAEI	RCC
232	AEKDGLTDY	GBM
233	DESEKTTKSF	GBM
234	EEESLLTSF	GBM
235	EEFETLKEF	GBM
236	EEKLIIQDF	GBM
237	LEMPHYSTF	GBM
238	SENPETITY	GBM
239	TEVLDSHIHAY	GBM
240	HELENHSMY	GBM
241	REAEPKPKM	GBM
242	FSDKELAAY	HCC
243	RSPNNFLSY	RCC
244	RSDPVTNLV	CRC

245	ITEKNSGLY	CRC
246	YSDLHAFYY	GBM
247	RSDPGGGGLAY	GBM
248	YSHAAGQGTGLY	CRC
249	ALFPERITV	GBM
250	KMILKMOVQL	RCC
251	RLASRPLLL	GBM
252	RIYNGIGVSR	RCC
253	KLFGTSGQK	GBM
254	AVATKQVVK	GBM
255	LPDGSQVEL	CRC
256	LPALPQQLI	CRC
257	SPLRGGSSL	CRC
258	APSGTRVVQVL	GBM
259	RPAVGHSGL	HCC
260	EEAPLVTKAF	HCC
261	IEALLESSL	RCC
262	MELLLVNKL	RCC
263	QQATPGPAY	CRC
264	DEYLIPQQGF	RCC
265	EEVDVPIKLY	CRC
266	ARLTPIPFGL	HCC

Таблица 86: Сводка данных презентации выбранных опухолеассоциированных пептидов по настоящему изобретению среди различных видов рака (заболеваний). РМЖ = рак молочной железы, ХГК = рак желчных протоков, ГБМ = рак головного мозга, КРК = колоректальная карцинома, РП = рак пищевода, РЖП = аденокарцинома желчного пузыря, РЖ = рак желудка, ПлККГШ = плоскоклеточная карцинома головы и шеи, ГКК = гепатоклеточная карцинома, МЕЛ = меланома, НХЛ = неходжкинская лимфома, НМРЛадено = немелкоклеточный рак легких - аденокарцинома, НМРЛдругие = образцы НМРЛ, которые не могут быть однозначно отнесены к НМРЛадено и НМРЛплоск, НМРЛплоск = плоскоклеточный немелкоклеточный рак легких, РЯ = рак яичника, РПЖ = рак поджелудочной железы, РПрЖ = рак предстательной железы и доброкачественная гиперплазия предстательной железы, ПКК = почечноклеточная карцинома, МРЛ = мелкоклеточный рак легких, РМП = рак мочевого пузыря, РЭМ = рак матки.

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептида на различных видах опухолей
1	RSDPVTLDV	РЖП, РЖ
2	LPSPTDSNFY	ХГК, РП
5	SILGSDVRVPSY	НМРЛадено, РПЖ
6	VLDLSTNVY	ХГК, РЖП
8	TPVTEFSLNTY	РМЖ, ХГК, РЖП, РЖ, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, ПКК, МРЛ, РМП, РЭМ
9	FITAQNHG Y	РЖ
10	ITAQNHG Y	РЖ
12	ITFGERFEY	КРК, РЖ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, РП, РПЖ, РПрЖ, РМП
13	GSTMVEHNY	РЖП, РПрЖ
14	YTERDGSAMVY	РМЖ, МРЛ, РЭМ
15	LTDYLKNTY	РЖП, РЖ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РПрЖ, ПКК, РЭМ
16	LSLIDRLVLY	ГКК, НМРЛплоск, РЭМ
17	YTDKLQHY	РМЖ, ПлККГШ, НМРЛадено, МРЛ
21	STDIGALMY	РМЖ, РЖП, РЖ, РПЖП, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, ПКК, МРЛ, РМП
22	TLEQVQLYY	РЖ
25	LMKEVMEHY	МЕЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, МРЛ
26	EVLDSHIHAY	РМЖ, КРК, РЖ, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛплоск, РП, РПЖ, РПрЖ, МРЛ, КМП
27	LDSHIHAY	МЕЛ
28	LTDYINANY	РЖ, МЕЛ, НМРЛплоск, РП
29	SVTDLEMPHY	НМРЛплоск, РП
30	VLDSHIHAY	РЖ, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛплоск, РП
31	VTDLEMPHY	РЖ, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛплоск, РП
33	FADKIHLAY	РЖП, РЖ, РП
34	ITDFNNIRY	РМЖ, РЖ, РПЖП, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, РП
36	YAAAYIIHAY	ПлККГШ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РП, РЭМ
37	LTDSFPLKV	ХГК
39	YLLPSVVLL	ОМЛ, РМЖ, ХГК, ХЛЛ, КРК, РЖП, РЖ, РПЖП, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, РПрЖ, ПКК, МРЛ, РМП, РЭМ
42	KMMALVAEL	РЯ
44	SQTGFVVLV	ОМЛ, РМЖ, ХГК, ХЛЛ, КРК, РЖП, РЖ, РПЖП, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, РПрЖ, ПКК, МРЛ, РМП, РЭМ

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептида на различных видах опухолей
45	KLLDEVTYL	РМЖ, ХГК, КРК, РЖП, ГБМ, РЖ, РПЖП, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, РПрЖ, МРЛ, РМП, РЭМ
46	VLITGLPLI	РМЖ, ХГК, КРК, ГКК, ПлККГШ, НМРЛплоск, РМП
47	YQDSWFQQL	ГКК, РМП
50	ELMPRVYTL	ХГК, ГБМ, ПлККГШ, НХЛ, НМРЛплоск, РПЖ, МРЛ, РМП
51	ALAAELNQL	НХЛ
53	LLMTSLTES	ОМЛ, РМЖ, ХЛЛ, КРК, РЖП, РЖ, ГКК, ПлККГШ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РПЖ, РПрЖ, МРЛ, РМП, РЭМ
56	FLNQIYTQL	КРК, РПЖП, РПЖ
60	GLPDFVKEL	РЖП, МЕЛ, РП
67	ATALSLSNK	ХГК
68	ATAYGSTVSK	ХГК, КРК, РЖП, РПЖ
70	ATWSASLKNK	ХГК
72	KQVFPGLNY	ХГК, КРК, ПКК, МРЛ
74	QLYSKFLLK	ХГК, РП, ПКК, МРЛ
75	QVPTFTIPK	ОМЛ, ХГК, РП, МРЛ
76	SAFGYVFPK	ОМЛ, РМЖ, ХГК, КРК, РЖП, РЖ, МЕЛ, НМРЛдругие, РП, РПЖ, РПрЖ, ПКК, МРЛ, РМП
82	TAYGSTVSK	ХГК, НХЛ
85	KMAAWPFSR	РМЖ, РЖП, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ
89	KITDFGLAK	ГБМ
90	GSRLGKYYVK	ГБМ, ГКК, ПлККГШ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РПЖ, МРЛ, РМП, РЭМ
91	SLIDRLVLY	РЖП, НМРЛадено, НМРЛплоск, РПЖ, МРЛ
92	AVLDLGSLAK	РМЖ, ХГК, КРК, РЖП, ГБМ, РЖ, ГКК, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, РПрЖ, МРЛ, РМП, РЭМ
94	KTYVGHPVKM	КРК, РЖП, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛадено, РПЖ
98	KLYPTYSTK	РП, МРЛ
99	ATMQSKLIQK	МРЛ
100	ALLGVIIAK	ХГК, КРК, НМРЛадено, РЯ, РМП, РЭМ
103	KSWTASSSY	КРК
104	STQDTLLIK	РМЖ, РЖП, РЖ, ПлККГШ, НХЛ, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, ПКК, МРЛ, РМП, РЭМ
105	GSAALYLLR	НМРЛплоск, РМП, РЭМ
107	EIYGGHNAGF	МРЛ
109	KIIAPLVTR	ГКК, НМРЛадено, РЯ, РЭМ

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептида на различных видах опухолей
112	KMMADYGIRK	РМЖ, ХГК, КРК, РЖП, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, ПКК, РЭМ
113	VWAKILSAF	ХЛЛ, РЖП, НХЛ
115	YFEEAANFL	ХГК, РЖП
117	NFLPPIIARF	КРК, РЖП, ГБМ, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛадено, РЯ, РП, РЭМ
118	TYISKTIAL	РМЖ, КРК, РЖП, ГБМ, РЖ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, РПрЖ, МРЛ, РМП, РЭМ
119	YMKALGVGF	ГБМ
120	MYAKEFDLL	РМЖ, ХЛЛ, КРК, РЖП, РЖ, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РП, РПЖ, РПрЖ, ПКК, РЭМ
121	SYIEKVRFL	РМЖ, НХЛ, МРЛ
122	KLYGMPTDFGF	РМЖ, КРК, ПлККГШ, НХЛ, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, РПрЖ, МРЛ, РМП
123	RQYLAINQI	РМЖ, ХГК, ХЛЛ, КРК, РЖП, ГБМ, РЖ, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, РПрЖ, ПКК, МРЛ, РМП
124	EVYSPEADQW	РП
125	IYGPKYIHPSF	РЖП, НМРЛадено
126	TFQDKTLNF	РЖ, МЕЛ, РП, РПрЖ, МРЛ, РМП, РЭМ
127	IFINLSPEF	ХГК, РЖП, НМРЛадено, РПЖ
128	SYTKVEARL	ХГК, КРК, РЖП, НМРЛадено, РПЖ
129	VFLNQIYTQL	РЖП, РПЖ
130	VYGDGHYLTf	НМРЛадено, РПЖ
132	VYNPVIYVF	ОМЛ, РМЖ, ХГК, ХЛЛ, КРК, РЖП, ГБМ, РЖ, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, РПрЖ, ПКК, МРЛ, РМП, РЭМ
134	TYLTGRQF	РЖ, РП, РПрЖ, МРЛ, РЭМ
135	VIAPIISNF	ОМЛ, РМЖ, ХГК, ХЛЛ, РЖП, ГБМ, РЖ, ГКК, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РПЖ, РПрЖ, ПКК, МРЛ, РЭМ
136	EYNNIQHLF	РЖП, ГБМ, РЖ, ГКК, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РПрЖ, РМП, РЭМ
137	KYLSLSNSF	ГКК, РЯ, РПЖ, РПрЖ
138	KYLSIPTVF	НМРЛадено
139	PYASLASELF	РЖ
140	KYLSIPAVF	ХГК, РЖП, РЖ, ПлККГШ
141	KYLSIPAVFF	РЖП, РЖ, ПлККГШ, МРЛ
142	SSFPGAGNTW	РП, МРЛ

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептида на различных видах опухолей
144	IPEPSAQQQL	ХГК, КРК, РЖП, НХЛ
145	RVPSYTLIL	НМРЛплоск, РПрЖ
147	SPIKVPLLL	РЖП, РЖ, РП, РПЖ, ПКК
148	VPDGVSKVL	ХГК
150	KPSSKALGTSL	РЖП
151	VVHPRTLIL	ХГК, ГКК, РЭМ
155	FPYPYAERL	РЖ, ПлККГШ, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ
156	HPQVVILSL	РЖП
157	SPSPGKDPTL	НМРЛадено, РПрЖ
159	FPAHPSLLL	НМРЛадено
160	RPAPADSAL	РЖП, НМРЛадено
161	NPYEGRVEV	КРК, РЖП, ГБМ, РЖ, МЕЛ
162	MPMISIPRV	ГБМ, НХЛ
163	RPASSLRP	РЯ
165	TRIAKVSEL	ГКК, РЯ, РЭМ
166	HDPDVGSNSL	РМЖ, КРК, РЖП, РЖ, ГКК, ПлККГШ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, РПрЖ, МРЛ, РМП, РЭМ
167	YPSEVEHMF	МЕЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РПрЖ, РЭМ
168	IPTDKLLVI	РМЖ, КРК, РЖП, ГБМ, РЖ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, МРЛ, РМП, РЭМ
169	FPTEVTPHAF	ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛплоск, МРЛ
171	APKLFVAFAF	НМРЛадено
173	MVPSAGQLALF	РЖ, ПлККГШ, РП, МРЛ
174	VPSLQRLML	КРК, НМРЛадено
175	HPIETLVDIF	ХГК, КРК, РЖП, ГБМ, РЖ, МЕЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, МРЛ, РМП, РЭМ
177	DLKYNALDL	ХГК
178	HAKEKLTAI	ХГК
180	LLKAEPLAF	ХГК, РЖП, ПКК, МРЛ
182	LPFLRENDL	РПрЖ, РЭМ
183	FQKLKLLSL	РЖП, РПЖ
188	SALDHVTRL	НХЛ, РПрЖ
190	SRSMLLLL	КРК
192	LPMLKVLNL	ПлККГШ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ
193	LSYNKYLQL	ГКК, РЭМ
194	EAKRHLLQV	ХГК, МЕЛ, НХЛ, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, МРЛ
195	AEAVLKTQL	ХГК

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептида на различных видах опухолей
196	AEQTGTWKL	ХГК
197	EEAKQVLFL	ПКК
198	FELPTGAGL	ХГК, ПлККГШ, ПКК, МРЛ
199	GEATLQRIY	ХГК, КРК
200	GEELGFASL	ХГК, ПКК, МРЛ
206	SEPINIIDAL	ХГК, ПКК, МРЛ
207	TEATMTFKY	ХГК, РЖП
208	AEHDAVRNAL	РЖ, ПлККГШ
209	YEVDTVLRV	РМЖ, МЕЛ
210	SENIVIQVY	ХГК, МЕЛ, НМРЛдругие
212	AEETCAPSV	РМЖ, МЕЛ, РЭМ
214	AEQPDGLIL	ХГК, МРЛ
218	AEGGKVPKWK	ПлККГШ, НМРЛадено, РПрЖ, РЭМ
219	AENAEYLRV	ПКК
220	KEITGFLLI	НМРЛадено, РЭМ
223	SEVPVARVW	ХГК, КРК, РЖП, НМРЛадено, РП, ПКК
224	SESAVFHGF	РМЖ, ХГК, КРК, РЖП, ГБМ, РЖ, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, РПрЖ, МРЛ, РМП, РЭМ
226	EELLHGQLF	ХГК, КРК, НМРЛадено, РП, РПЖ
227	TEHTQSQAAW	ХЛЛ, ГКК, ПлККГШ, НМРЛадено, РЭМ
229	KESDGFHRF	РМЖ, ХГК, КРК, РЖП, ГБМ, РЖ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, МРЛ, РМП, РЭМ
230	AENLFRAFL	ОМЛ, ХГК, ХЛЛ, РЖП, РЖ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, РПрЖ, ПКК, РМП, РЭМ
232	AEKDGLTDY	МЕЛ
234	EEESLLTSF	НМРЛплоск, РП
235	EEFETLKEF	ПлККГШ, МЕЛ
236	EEKLIQDF	ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РП, РПрЖ
238	SENPETITY	ПлККГШ
239	TEVLDSHIHAY	МЕЛ, НМРЛплоск, РП
240	HELENHSMY	РП
242	FSDKELAAAY	РМЖ, ХГК, РЖП, ГБМ, РЖ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РП, РПЖ
243	RSPNNFLSY	РЖП
244	RSDPVTNLV	РМЖ, РЖП, РЖ, НМРЛадено, РПЖ
245	ITEKNSGLY	РЖП, РЖ

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептида на различных видах опухолей
246	YSDLHAFYY	ОМЛ, РМЖ, ХЛЛ, КРК, РЖП, РЖ, РПЖП, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РП, РПЖ, РПрЖ, ПКК, МРЛ, РМП, РЭМ
247	RSDPGGGGLAY	ОМЛ, РМЖ, КРК, РЖП, РЖ, РПЖП, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, РПрЖ, МРЛ, РМП, РЭМ
248	YSHAAGQGTGLY	РМЖ, РЖП, ПлККГШ, РП, РЭМ
249	ALFPERITV	ОМЛ, РМЖ, ХГК, РЖП, ГБМ, РЖ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, РПрЖ, ПКК, МРЛ, РМП, РЭМ
251	RLASRPLLL	НМРЛплоск, РЯ, РП
252	RIYNGIGVSR	КРК, ГБМ, МЕЛ, НМРЛадено
254	AVATK FVNK	ОМЛ, РМЖ, ХГК, КРК, РЖП, РЖ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, РПрЖ, ПКК, МРЛ, РМП, РЭМ
255	LPDGS RVEL	РМЖ
256	LPALPQQLI	РЖП, ГБМ, РЖ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РП, РПЖ, МРЛ, РЭМ
257	SPLRGGSSL	ОМЛ, РМЖ, РЖ, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РП, МРЛ, РМП
258	APSGTRVVQVL	РМЖ, ХГК, КРК, РЖП, РЖ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, РПрЖ, ПКК, МРЛ, РМП, РЭМ
259	RPAVGHSGL	ОМЛ, РМЖ, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РП, ПКК
260	EEAPLVTKAF	ОМЛ, ХЛЛ, КРК, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РПрЖ, РЭМ
261	IEALLESSL	РМЖ, ХГК, ХЛЛ, КРК, РЖП, ГБМ, РЖ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, РПрЖ, МРЛ, РМП, РЭМ
262	MELL LVNKL	ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, РЯ, РЭМ
263	QQATPGPAY	ОМЛ, РМЖ, ХГК, РЖП, РЖ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РП, РПЖ, РМП
264	DEYLIPQQGF	РМЖ, ХГК, КРК, РЖП, ГБМ, РЖ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, РПрЖ, МРЛ, РМП, РЭМ
265	EEVDVPIKLY	РМЖ, ХГК, РЖ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, РПрЖ, ПКК, МРЛ, РЭМ
266	ARLTPIPFGL	РМЖ, ГБМ, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, ПКК, МРЛ, РМП, РЭМ

ПРИМЕР 2:

Определение профиля экспрессии генов, кодирующих пептиды по изобретению

Избыточной презентации или специфической презентации пептида на опухолевых клетках по сравнению с нормальными клетками достаточно для его пригодности в иммунотерапии, и некоторые пептиды являются опухолеспецифическими, несмотря на присутствие их исходных белков также и в нормальных тканях. Тем не менее, выявление профилей экспрессии мРНК приносит дополнительный уровень безопасности при отборе пептидных мишеней для иммунотерапии. В особенности в случае терапевтических методов с высокой степенью риска для безопасности, таких как ТКР с созревшей аффинностью, идеальный целевой пептид будет получен из белка, являющегося уникальным для опухоли и не встречающегося в нормальных тканях.

Источники и приготовление РНК

Хирургически удаленные тканевые препараты были предоставлены различными организациями, которые перечислены выше (см. Пример 1) после получения письменной формы информированного согласия от каждого пациента. Препараты опухолевой ткани были мгновенно заморожены после операции и впоследствии гомогенизированы с помощью ступки и пестика в жидком азоте. Суммарная РНК была приготовлена из данных образцов с использованием реагента TRI (Ambion, Дармштадт, Германия) с последующей очисткой на RNeasy (QIAGEN, Хильден, Германия); оба метода осуществлялись в соответствии с указаниями производителей.

Суммарная РНК здоровых тканей человека для экспериментов по секвенированию РНК (RNASeq) была получена из: Asterand (Детройт, Мичиган, США и Ройстон, Хартфордшир, Великобритания); Bio-Options Inc. (Бри, Калифорния, США); Geneticist Inc. (Глендейл, Калифорния, США); ProteoGenex Inc. (Кальвер-Сити, Калифорния, США); Tissue Solutions Ltd (Глазго, Великобритания). Суммарная РНК опухолевых тканей для экспериментов RNASeq была получена из: Asterand (Детройт, Мичиган, США и Ройстон, Хартфордшир, Великобритания), BioCat GmbH (Гейдельберг, Германия), BioServe (Белтсвилль, Мэриленд, США), Geneticist Inc.

(Глендейл, Калифорния, США), Istituto Nazionale Tumori «Pascale» (Неаполь, Италия), ProteoGenex Inc. (Кальвер-Сити, Калифорния, США), Университетской клиники г. Гейдельберг (Гейдельберг, Германия). Качество и количество всех образцов РНК оценивали на биоанализаторе Agilent 2100 (Agilent, Вальдбронн, Германия) с использованием набора RNA 6000 Pico LabChip Kit (Agilent).

Эксперименты по секвенированию РНК

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

Типичные профили экспрессии исходных генов, предложенных в настоящем изобретении, которые в высокой степени экспрессированы в избытке или исключительно экспрессированы в клетках колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы и почечно-клеточной карциномы представлены на Фигуре 1. Показатели экспрессии других отдельных генов показаны в Таблице 9.

Таблица 9: Показатели экспрессии. В таблице представлены пептиды, полученные из генов, которые в очень высокой степени избыточно экспрессируются в опухолях в сравнении с панелью нормальных тканей (+++), в высокой степени избыточно экспрессируются в опухолях в сравнении с панелью нормальных тканей (++) или избыточно экспрессируются в опухолях в сравнении с панелью нормальных тканей (+). Фоновый уровень данного балла рассчитывали по измерениям следующих соответствующих нормальных тканей: клетки крови, кровеносные сосуды, ткань головного мозга, сердца, печени, легких, жировая ткань, ткань надпочечника, желчного протока, мочевого пузыря, костного мозга, хрящевая ткань, ткань пищевода, глаза, желчного пузыря, головы и шеи, почки, толстой кишки, лимфатического узла, нерва, поджелудочной железы, парашитовидной железы, брюшины, гипофиза, плевры, скелетных мышц, кожи, тонкой кишки, селезенки, желудка, щитовидной железы, трахеи, мочеточника. В случае, если в наличии имелись данные для нескольких образцов одного и того же вида ткани, для расчетов использовали среднее арифметическое всех соответствующих образцов.

SEQ ID No	Последовательность	Экспрессия гена				
		КРК	ГБМ	РЖ	ГКК	ПКК
1	RSDPVTLDV	+				
2	LPSPTDSNFY		+++			+
3	ASSTDSASY				++	
4	NSDLKYNAL				+	
5	SILGSDVRVPSY				+	
6	VLDLSTNVY				++	
7	LITGDPKAAAYDY	+	+	+		
8	TPVTEFSLNTY	+		+		
9	FITAQNHGY				+	
10	ITAQNHGY				+	
11	LSAGSGPGQY				+	
12	ITFGERFEY					+
13	GSTMVEHNY			+		+
14	YTERDGSAMVY		+			
15	LTDYLKNTY				+	
16	LSLIDRLVLY					+
17	YTDKLQHY	+				
18	EVSNGKWLLY					+

SEQ ID No	Последовательность	Экспрессия гена				
		КРК	ГБМ	РЖ	ГКК	ПКК
19	VSNGKWLLY					+
20	STDEITTRY				++	
21	STDIGALMY	+		++		
22	TLEQVQLYY	+				
23	TASEDVFAQY	+				
24	YTHHLFIFY	++				
25	LMKEVMEHY					+
26	EVLDSHIHAY		++			
27	LDSHIHAY		++			
28	LTDYINANY		+++			
29	SVTDLEMPHY		+++			
30	VLDSDHIHAY		++			
31	VTDLMPHY		+++			
32	ATVGYFIFY				+	+
33	FADKIHLAY				++	+
34	ITDFNNIRY	+		+		
35	FASDLLHLY				+++	
36	YAAYIIHAY					+
37	LTDSFPLKV				+	
38	VMLNSNVLL		+			
39	YLLPSVLL		+			
40	KIDDIWNLEV				+	
41	SLQDTKITL				+	
42	KMMALVAEL					++
43	GLMTIVTSL	++				
44	SQTGFVVLV		+			
45	KLLDEVTYL					+
46	VLITGLPLI					+
47	YQDSWFQQL					+
48	NLTFIILI				+++	
49	NLASRPYSL				+	
50	ELMPRVYTL	+	+	+	+	+
51	ALAAELNQL		+			
52	YVSSGEMMV		+			
53	LLMTSLTES		+			
54	YLPPTDPRMSV		+++			
55	RLWQIQHHL					+
56	FLNQIYTQL			+		
57	GLTGVIMTI	++				

SEQ ID No	Последовательность	Экспрессия гена				
		КРК	ГБМ	РЖ	ГКК	ПКК
58	MLCLLLTL				++	+
59	KLHEIYIQA		+			
60	GLPDFVKEL	+++		++		
61	RLFGLFLNNV					+
62	GSYSALLAKK				+	
63	KVLGPNGLLK				+	
64	STTKLYLAK				+	
65	VLGPNGLLK				+	
66	ATYEGIQKK				+	
67	ATALSLSNK				+	
68	ATAYGSTVSK				++	
69	ATAYGSTVSKR				++	
70	ATWSASLKNK				+	
71	KLGNPNVSK				+	
72	KQVFPGLNY				++	
73	KSFDRHFEEK				+	
74	QLYSKFLLK				+	
75	QVPTFTIPK				++	
76	SAFGYVFPK				+	
77	SSASLAHMK				+	
78	STKSTSPPK				++	
79	STNNEGNLK				+	
80	STSHHLVSR				+	
81	SVKLQGTSK				+	
82	TAYGSTVSK				++	
83	TAYGSTVSKR				++	
84	TVASLHTEK				+	
85	KMAAWPFSR				+	
86	KTPSGALHRK				+	
87	SSYSRSSAVK		+			
88	MLLQQPLIY					+
89	KITDFGLAK		+++			+
90	GSRLGKYYVK					+
91	SLIDRLVLY					+
92	AVLDLGSLAK					+
93	ALDKPGKSK		+			
94	KTYVGHPVKM	+	+	+	+	+
95	RLFESSFHY					++
96	FSLAGALNAGFK		+			

SEQ ID No	Последовательность	Экспрессия гена				
		КРК	ГБМ	РЖ	ГКК	ПКК
97	RMPPPLPTR		+			
98	KLYPTYSTK				+	
99	ATMQSKLIQK	+++				+
100	ALLGVIIAK					++
101	GVIIAKKYFFK					++
102	IIAKKYFFK					++
103	KSWTASSSY		+	+		+
104	STQDTLLIK	+		+		
105	GSAALYLLR					++
106	RLSPNDQYK					++
107	EIYGGHHAGF		++			
108	LLKSSVGNFY		+			
109	KIIAPLVTR					+
110	GTESGTILK		++			+++
111	KIKEHVRSK				+	
112	KMMADYGIRK				+	
113	VWAKILSAF				+	
114	KFLDSNIKF				+	
115	YFEEAANFL				+	
116	LVLDYSKDYNHV				+	
117	NFLPPIIARF					+
118	TYISKTIAL					+
119	YMKALGVGF		+			+
120	MYAKEFDLL				+	
121	SYIEKVRFL		+			
122	KLYGMPTDFGF			+		
123	RQYLAINQI				+	
124	EVYSPEADQW		+++			
125	IYGPKYIHPSF	++		+		
126	TFQDKTLNF	++		+		
127	IFINLSPEF			+		
128	SYTKVEARL			+		
129	VFLNQIYTQL			+		
130	VYGDGHYLTf			+		
131	KQLDHNLTf	++				
132	VYNPVIYVF				+	
133	SFDSNLLSF	+++		+		
134	TYLTGRQF	+				
135	VIAPIISNF	+				

SEQ ID No	Последовательность	Экспрессия гена				
		КРК	ГБМ	РЖ	ГКК	ПКК
136	EYNNIQHLF					+
137	KYLSLSNSF					+
138	KYLSIPTVF				+++	
139	PYASLASELF				+	
140	KYLSIPAVF				+	
141	KYLSIPAVFF				+	
142	SSFPGAGNTW		+			
143	FELPTGAGLQL				++	
144	IPEPSAQQ				++	
145	RVPSYTLIL				+	
146	SPGDKRLAA				++	
147	SPIKVPLLL				+	
148	VPDGVSKVL				++	
149	YPLTGDTL				++	
150	KPSSKALGTSL	+				
151	VVHPRTL					+
152	IPSRLAIL					+
153	APAAVPSAPA	++	++	+++	+	
154	GPGTRL		+			
155	FPYPYAERL	++		++		
156	HPQVVILSL					++
157	SPSPGKDPTL					+
158	VPERGEPEL					+
159	FPAHPSLL					+
160	RPAPADSAL					+++
161	NPYEGRVEV					+
162	MPMISIPRV					+
163	RPASSLRP	++		+++	+	
164	ISTPSEVSTPL			+		
165	TPIAKVSEL	+			+++	
166	HDPDVGSNSL		+			
167	YPSEVEHMF					+
168	IPTDKLLVI					+
169	FPTEVTPHAF		+++			
170	SPMWHVQQL					+++
171	APKLFAVAF					+
172	KPAHYPLIAL				+	++
173	MVPSAGQLALF					++
174	VPSLQRLML					+

SEQ ID No	Последовательность	Экспрессия гена				
		КРК	ГБМ	РЖ	ГКК	ПКК
175	HPIETLVDIF					+
176	AAMSRYEL				+	
177	DLKYNALDL				+	
178	HAKEKLTAL				+	
179	IQIYKKLRTSSF				+	
180	LLKAEPLAF				+	
181	YKKLRTSSF				+	
182	LPFLRENDL		+			
183	FQKLKLLSL	+				
184	EPVKK SRL					+
185	NPNLKTLL		+			
186	SLIDRLVL					+
187	YVKERSKAM					+
188	SALDHVTRL					+
189	HIFLRTTL				+	
190	SRSMLLLL	++		+++		
191	LINLKYLSL					+
192	LPMLKVLNL					+
193	LSYNKYLQL					+
194	EAKRHLLQV				+	
195	AEAVLKTQL				++	
196	AEQTGTWKL				+	
197	EEAKQVLFL				+	
198	FELPTGAGL				++	
199	GEATLQRIY				+	
200	GEELGFASL				++	
201	GEHTSKATL				+	
202	KEFNLQNMGL				++	
203	KENFAGEATL				+	
204	KESQLPTVM				++	
205	QEVLLQTFL				++	
206	SEPINIIDAL				+	
207	TEATMTFKY				++	
208	AEHDAVRNAL	++				
209	YEVDTVLRV		+++			
210	SENIVIQVY				+	
211	TEKEMIQKL					++
212	AEETCAPSV					+
213	TTMDQKSLW		+			

SEQ ID No	Последовательность	Экспрессия гена				
		КРК	ГБМ	РЖ	ГКК	ПКК
214	AEQPDGLIL				+	
215	AFITAQNHGY				+	
216	LQEEKVPAIY				+	
217	NEINEKIAPSF				+	
218	AEGGKVPIKW		+++			+
219	AENAEYLRV		++			
220	KEITGFLLI		+++			
221	AEERAEAKKKF					+
222	NEISTFHNL				+	
223	SEVPVARVW				+	
224	SESAVFHGF					+
225	SEAFPSRAL					+++
226	EELLHGQLF			+		
227	TEHTQSQAAW					+
228	AEKQTPDGRKY		++			
229	KESDGFHRF					+
230	AENLFRAFL	+				
231	AEIHTAEI					+++
232	AEKDGKLTDY		+++			
233	DESEKTTKSF		+++			
234	EEESLLTSF		+++			
235	EEFETLKEF		++			
236	EEKLIQDF		++			
237	LEMPHYSTF		+++			
238	SENPETITY		+++			
239	TEVLDSHIHAY		++			
240	HELENHSMY		+			
241	REAEPKPM		+			
242	FSDKELAAY				+	
243	RSPNNFLSY					+
244	RSDPVTNLV	+				
245	ITEKNGLY	++				
246	YSDLHAFYY		+			
247	RSDPGGGGLAY		+			
248	YSHAAGQGTGLY	+				
249	ALFPERITV		+			
250	KMILKMVQL	+		+		+++
251	RLASRPLLL		+			
252	RIYNGIGVSR			+		+

SEQ ID No	Последовательность	Экспрессия гена				
		КРК	ГБМ	РЖ	ГКК	ПКК
253	KLFGTSGQK		+++			
254	AVATKFVNK		+			
255	LPDGSRVEL	++		+	+++	++
256	LPALPQQLI	+		+		
257	SPLRGGSSL	+				
258	APSGTRVVQVL		+			
259	RPAVGHSGL				+	
260	EEAPLVTKAF				+	
261	IEALLESSL					+
262	MELLLVNKL					+
263	QQATPGPAY	++				
264	DEYLIPQQGF		+++			+
265	EEVDVPIKLY	+				
266	ARLTPIPFGL				+	

ПРИМЕР 3:

Иммуногенность *in vitro* для пептидов, презентруемых МНС I класса

Для получения информации об иммуногенности пептидов TUMAP по настоящему изобретению заявители провели исследования с использованием прайминга Т-клеток *in vitro* на основе повторных стимуляций CD8+ Т-клеток искусственными антигенпрезентирующими клетками (иАПК), нагруженными комплексами пептид-МНС и антителом к CD28. Таким образом заявители могли показать иммуногенность для рестриктированных по HLA-A*02:01, HLA-A*24:02, HLA-A*01:01, HLA-A*03:01, HLA-B*07:02 и HLA-B*44:02 пептидов TUMAP по изобретению, демонстрируя, что эти пептиды являются Т-клеточными эпитопами, против которых у человека имеются CD8+ Т-клетки-предшественники (Таблица 10а и Таблица 10б).

Прайминг CD8+ Т-клеток *in vitro*

В целях проведения стимуляций *in vitro* искусственными антигенпрезентирующими клетками, нагруженными комплексом пептид-МНС (pMHC) и антителом к CD28, заявители сначала выделили CD8+ Т-клетки из свежего продукта лейкофереза HLA-A*02, HLA-A*24, HLA-A*01, HLA-A*03, HLA-B*07 или HLA-B*44 методом

позитивной селекции с помощью анти-CD8 микросфер (Miltenyi Biotec, Бергш-Гладбах, Германия). Кровь была получена от здоровых доноров (после подписания формы информированного согласия) из Университетской клиники г. Мангейм, Германия.

МКПК и выделенные CD8⁺ лимфоциты инкубировали до использования в Т-клеточной среде (TCM), состоящей из RPMI-Glutamax (Invitrogen, Карлсруэ, Германия) с добавлением 10% инактивированной нагреванием человеческой сыворотки АВ (PAN-Biotech, Эйденбах, Германия), 100 Ед/мл пенициллина / 100 мкг/мл стрептомицина (Cambrex, Кёльн, Германия), 1 мМ пирувата натрия (CC Pro, Обердорла, Германия) и 20 мкг/мл гентамицина (Cambrex). 2,5 нг/мл ИЛ-7 (PromoCell, Гейдельберг, Германия) и 10 Ед/мл ИЛ-2 (Novartis Pharma, Нюрнберг, Германия) также добавляли на этом этапе в среду TCM.

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

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

рМНС, использованные для положительных и отрицательных контрольных стимуляций, были A*0201/MLA-001 (пептид ELAGIGILTV (SEQ ID NO. 269) из модифицированного Melan-A/MART-1) и A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI из DDX5, SEQ ID NO. 270), соответственно.

800 000 микросфер / 200 мкл вносили в лунки 96-луночного планшета в присутствии 4 x 12,5 нг другого биотинилированного комплекса рМНС, промывали и затем добавляли 600 нг биотинилированных антител к CD28 в объеме 200 мкл. Стимуляцию проводили в 96-луночных планшетах путем совместной инкубации 1×10^6 CD8+ Т-клеток с 2×10^5 промытых покрытых микросфер в 200 мкл среды TCM с добавлением 5 нг/мл ИЛ-12 (PromoCell) в течение 3 дней при 37°C. Половина среды была затем заменена на свежую среду TCM с добавлением 80 Ед/мл ИЛ-2, и инкубация была продолжена в течение 4 дней при 37°C. Данный цикл стимуляций производили в общей сложности три раза. Для считывания с рМНС-мультимеров использовали 8 различных молекул рМНС на цикл. Использовался двумерный комбинаторный подход к кодировке, как было описано ранее (Andersen et al., 2012) с незначительными изменениями, относящимися к мечению с 5 различными флуорохромами. Наконец, проводили анализ мультимеров посредством окрашивания клеток набором для определения жизнеспособности клеток при воздействии ближнего ИК-излучения с красителем Live/dead (Invitrogen, Карлсруэ, Германия), клоном SK1 антител CD8-FITC (BD, Гейдельберг, Германия) и мультимерами рМНС с флуоресцентными метками. Для анализа использовали цитометр BD LSRII SORP, снабженный подходящими лазерами и фильтрами. Пептид-специфические клетки были подсчитаны как процентная доля от всех CD8+ клеток. Оценку результатов анализа мультимеров проводили с помощью программы FlowJo (Tree Star, Орегон, США). Прайминг *in vitro* специфических мультимер-положительных CD8+ лимфоцитов оценивали сравнением со стимуляциями отрицательного контроля. Иммуногенность для заданного антигена была определена, если было обнаружено, что по меньшей мере в одной подлежащей оценке простимулированной *in vitro* лунке одного здорового донора содержалась специфическая CD8+ Т-клеточная линия после стимуляции *in vitro* (т. е. когда данная лунка содержала по меньшей мере 1% специфичных мультимер-положительных среди CD8-положительных Т-клеток и процентная доля специфичных мультимер-положительных клеток была по меньшей мере в 10 раз выше медианного значения стимуляций отрицательного контроля).

Иммуногенность *in vitro* для пептидов колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы и почечно-клеточной карциномы

Для проанализированных пептидов, связанных с молекулами HLA I класса, иммуногенность *in vitro* могла быть продемонстрирована генерированием пептид-специфических Т-клеточных линий. Типичные результаты проточного цитометрического анализа после TUMAP-специфического окрашивания мультимерами для 13 пептидов по изобретению показаны на Фигурах 2 – 9 вместе с соответствующими отрицательными контролями. Результаты для 56 пептидов по изобретению обобщаются в Таблицах 10а и 10б.

Таблица 10а: Иммуногенность *in vitro* пептидов HLA I класса по изобретению

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

Seq ID No	Последовательность	Положительные лунки [%]
267	KT LGKLWRL	++++
268	DYIPYVFKL	

Таблица 10б: Иммуногенность *in vitro* пептидов HLA I класса по изобретению

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

Seq ID No	Последовательность	Положительные лунки [%]	HLA
1	RS DPVTLDV	"++"	A*01
6	VL DLSTNVY	"++"	A*01
20	ST DEITTRY	"+"	A*01
24	YTHHLFIFY	"+"	A*01
28	LT DYINANY	"+"	A*01
31	VT DLEMPHY	"+"	A*01
33	FADKIHLAY	"++"	A*01
37	LT DSFPLKV	"+++"	A*01
245	ITEKNSGLY	"+++"	A*01
247	RS DPGGGGLAY	"+"	A*01

Seq ID No	Последовательность	Положительные лунки [%]	HLA
38	VMLNSNVLL	"+"	A*02
42	KMMALVAEL	"++++"	A*02
43	GLMTIVTSL	"++"	A*02
50	ELMPRVYTL	"+"	A*02
56	FLNQIYTQL	"+++"	A*02
57	GLTGVIMTI	"++++"	A*02
60	GLPDFVKEL	"++"	A*02
249	ALFPERITV	"++"	A*02
250	KMILKMVQL	"++"	A*02
64	STTKLYLAK	"+"	A*03
66	ATYEGIQKK	"+"	A*03
82	TAYGSTVSK	"+"	A*03
94	KTYVGHPVKM	"+"	A*03
105	GSAALYLLR	"+"	A*03
110	GTESGTILK	"+"	A*03
138	KYLSIPTVF	"+"	A*24
144	IPEPSAQQQL	"+"	B*07
146	SPGDKRLAA	"++"	B*07
148	VPDGVSKVL	"+++"	B*07
155	FPYPYAERL	"+++"	B*07
156	HPQVVILSL	"++"	B*07
164	ISTPSEVSTPL	"+"	B*07
170	SPMWHVQQQL	"++++"	B*07
172	KPAHYPLIAL	"+++"	B*07
255	LPDGSRVEL	"++++"	B*07
195	AEAVLKTQL	"+"	B*44
198	FELPTGAGL	"++"	B*44
200	GEELGFASL	"+"	B*44
204	KESQLPTVM	"++"	B*44
205	QEVLLQTFL	"+"	B*44
208	AEHDAVRNAL	"+"	B*44
209	YEVDTVLRV	"+"	B*44
218	AEGGKVPIKW	"++"	B*44
219	AENAEYLRV	"+++"	B*44
220	KEITGFLLI	"++"	B*44
225	SEAFPSRAL	"+++"	B*44
232	AEKDGKLTDY	"+"	B*44
233	DESEKTTKSF	"++++"	B*44
235	EEFETLKEF	"+"	B*44

Seq ID No	Последовательность	Положительные лунки [%]	HLA
236	EEKLIQDF	"++++"	B*44
237	LEMPHYSTF	"+++"	B*44
238	SENPETITY	"++"	B*44
239	TEVLDSIHAY	"++++"	B*44
264	DEYLIPQQGF	"+"	B*44

ПРИМЕР 4:

Синтез пептидов

Все пептиды были синтезированы стандартным и общепринятым методом твердофазного синтеза пептидов с использованием Fmoc-методики. Идентичность и чистоту каждого отдельного пептида определяли с помощью масс-спектрометрии и аналитической ОФ ВЭЖХ. Были получены пептиды в виде белого или грязно-белого лиофилизата (соль трифторацетата) со степенью чистоты >50%. Все пептиды TUMAP предпочтительно вводят в виде солей трифторацетатов или ацетатов, возможны также другие солевые формы.

ПРИМЕР 5:

Анализ связывания МНС

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

В 96-луночные планшеты MAXISorp (NUNC) на ночь вносили 2 мкг/мл стрептавидина в PBS при комнатной температуре, промывали 4 раза и блокировали в течение 1 часа при 37°C в блокирующем буфере, содержащем 2% БСА. Полученные в результате рефолдинга мономеры HLA-A*02:01/MLA-001 служили в качестве стандарта, охватывающего диапазон 15-500 нг/мл. Мономерные комплексы пептид-MHC после реакции обмена под воздействием УФ-излучения 100-кратно разводили в блокирующем буфере. Образцы инкубировали в течение 1 ч при 37°C, промывали четыре раза, инкубировали в течение 1 ч при 37°C с 2 мкг/мл пероксидазы хрена, конъюгированной с антителом к $\beta 2m$, снова промывали и проводили обнаружение с помощью раствора ТМБ; реакцию останавливали NH_2SO_4 . Величину поглощения измеряли при длине волны 450 нм. Пептиды-кандидаты, которые демонстрировали высокий выход реакции обмена (предпочтительно более 50%, наиболее предпочтительно, более 75%) обычно являются предпочтительными для генерирования и получения антител или их фрагментов и/или Т-клеточных рецепторов или их фрагментов, поскольку они проявляют достаточную avidность по отношению к молекулам MHC и предотвращают диссоциацию комплексов MHC.

Таблица 11: Показатели связывания с молекулами MHC I класса. Связывание рестриктированных по молекулам HLA I класса пептидов с HLA-A*01:01 распределено по выходу пептидного обмена: >10% = +; >20% = ++; >50 = +++ ; > 75% = ++++

Seq ID No	Последовательность	Пептидный обмен
1	RSDPVTLDV	"+++"
2	LPSPTDSNFY	"++"
3	ASSTDSASY	"+++"
4	NSDLKYNAL	"++"
5	SILGSDVRVPSY	"++"
6	VLDLSTNVY	"++++"
7	LITGDPKAAYDY	"++"
8	TPVTEFSLNTY	"++"
9	FITAQNHGY	"++"
10	ITAQNHGY	"++"

Seq ID No	Последовательность	Пептидный обмен
11	LSAGSGPGQY	"+++"
12	ITFGERFEY	"+++"
13	GSTMVEHNY	"++"
14	YTERDGSAMVY	"+++"
15	LTDYLKNTY	"+++"
16	LSLIDRLVLY	"++"
17	YTDKLQHY	"+++"
18	EVSNGKWLLY	"+++"
19	VSNGKWLLY	"+++"
20	STDEITTRY	"+++"
21	STDIGALMY	"+++"
22	TLEQVQLYY	"+++"
23	TASEDVFAQY	"+"
24	YTHHLFIFY	"+"
25	LMKEVMEHY	"++"
26	EVLDSHIHAY	"+"
27	LDSHIHAY	"+"
28	LTDYINANY	"+++"
29	SVTDLEMPHY	"+"
30	VLDSDHIHAY	"+++"
31	VTDLEMPHY	"++++"
32	ATVGYFIFY	"++"
33	FADKIHLAY	"+++"
34	ITDFNNIRY	"+++"
35	FASDLLHLY	"++"
36	YAAAYIIHAY	"+++"
37	LTDSFPLKV	"+++"
242	FSDKELAAY	"++++"
243	RSPNNFLSY	"++"
244	RSDPVTNLV	"+++"
245	ITEKNSGLY	"+++"
246	YSDLHAFYY	"++++"
247	RSDPGGGGLAY	"+++"
248	YSHAAGQGTGLY	"+++"

Таблица 12: Показатели связывания с молекулами МНС I класса. Связывание рестриктированных по молекулам HLA I класса пептидов с HLA-A*02:01

распределено по выходу пептидного обмена: >10% = +; >20% = ++; >50 = +++; >75% = ++++

Seq ID No	Последовательность	Пептидный обмен
38	VMLNSNVLL	"++++"
39	YLLPSVVLL	"++++"
40	KIDDIWNLEV	"+++"
41	SLQDTKITL	"+++"
42	KMMALVAEL	"++++"
43	GLMTIVTSL	"++++"
44	SQTGFVVLV	"++"
45	KLLDEVTYL	"+++"
46	VLITGLPLI	"++++"
47	YQDSWFQQL	"+++"
49	NLASRPYSL	"++"
50	ELMPRVYTL	"+++"
51	ALAAELNQL	"+++"
52	YVSSGEMMV	"+++"
53	LLMTSLTES	"+++"
54	YLPPTDPRMSV	"++++"
55	RLWQIQHHL	"+++"
56	FLNQIYTQL	"++++"
57	GLTGVIMTI	"++++"
59	KLHEIYIQA	"++++"
60	GLPDFVKEL	"++++"
61	RLFGLFLNNV	"++++"
249	ALFPERITV	"++++"
250	KMILKMVQL	"+"
251	RLASRPLLL	"+++"

Таблица 13: Показатели связывания с молекулами МНС I класса. Связывание рестриктированных по молекулам HLA I класса пептидов с HLA-A*03:01 распределено по выходу пептидного обмена: >10% = +; >20% = ++; >50 = +++; >75% = ++++

Seq ID No	Последовательность	Пептидный обмен
62	GSYSALLAKK	"+++"
63	KVLGPNGLLK	"++"
64	STTKLYLAK	"++"

Seq ID No	Последовательность	Пептидный обмен
65	VLGPNGLLK	"++"
66	ATYEGIQKK	"++"
67	ATALSLSNK	"+++"
68	ATAYGSTVSK	"++"
70	ATWSASLKNK	"+++"
71	KLGNPNVSK	"++"
73	KSFDRHF EK	"+++"
74	QLYSKFLLK	"+++"
75	QVPTFTIPK	"++"
76	SAFGYVFPK	"+++"
77	SSASLAHMK	"++"
78	STKSTSPPK	"++"
79	STNNEGNLK	"++"
80	STSHHLVSR	"++"
81	SVKLQGTSK	"++"
82	TAYGSTVSK	"+++"
84	TVASLHTEK	"++"
85	KMAAWPFSR	"+++"
86	KTPSGALHRK	"++"
87	SSYSRSSAVK	"+++"
88	MLLQQPLIY	"++"
89	KITDFGLAK	"++"
90	GSRLGKYYVK	"+"
92	AVLDLGSL LAK	"+++"
93	ALDKPGKSK	"++"
94	KTYVGHVPKM	"+++"
95	RLFESSFHY	"+++"
96	FSLAGALNAGFK	"++"
97	RMPPPLPTR	"++"
98	KLYPTYSTK	"++"
99	ATMQSKLIQK	"+++"
100	ALLGVIIAK	"++"
101	GVIIAKKYFFK	"++"
102	IIAKKYFFK	"++"
104	STQDTLLIK	"++"
105	GSAALYLLR	"++"
106	RLSPNDQYK	"++"
109	KIIAPLVTR	"++"
110	GTESGTILK	"++"

Seq ID No	Последовательность	Пептидный обмен
111	KIKEHVRSK	"++"
112	KMMADYGIRK	"+++"
252	RIYNGIGVSR	"+++"
253	KLFGTSGQK	"+++"
254	AVATKFEVVK	"++"

Таблица 14: Показатели связывания с молекулами МНС I класса. Связывание рестриктированных по молекулам HLA I класса пептидов с HLA-A*24:02 распределено по выходу пептидного обмена: >10% = +; >20% = ++; >50 = +++; > 75% = ++++

Seq ID No	Последовательность	Пептидный обмен
113	VWAKILSAF	"+++"
114	KFLDSNIKF	"+++"
115	YFEEAANFL	"++"
116	LVLDYSKDYNHW	"+"
117	NFLPPIARF	"++++"
118	TYISKTIAL	"+++"
120	MYAKEFDLL	"+++"
121	SYIEKVRFL	"+++"
122	KLYGMPTDFGF	"++"
123	RQYLAINQI	"+"
125	IYGPKYIHPSF	"++++"
126	TFQDKTLNF	"+++"
127	IFINLSPEF	"++++"
128	SYTKVEARL	"+++"
129	VFLNQIYTQL	"++"
130	VYGDGHYLTf	"+++"
133	SFDSNLLSF	"+"
134	TYLTGRQF	"++"
135	VIAPIISNF	"+++"
136	EYNNIQHLF	"+++"
137	KYLSLSNSF	"++++"
138	KYLSIPTVF	"++++"
139	PYASLASELF	"++++"
140	KYLSIPAVF	"++++"
141	KYLSIPAVFF	"++++"

Таблица 15: Показатели связывания с молекулами МНС I класса. Связывание рестриктированных по молекулам HLA I класса пептидов с HLA- B*07:02 распределено по выходу пептидного обмена: >10% = +; >20% = ++; >50 = +++; > 75% = ++++

Seq ID No	Последовательность	Пептидный обмен
143	FELPTGAGLQL	"++"
144	IPEPSAQQQL	"++"
145	RVPSYTLIL	"++++"
146	SPGDKRLAA	"++++"
147	SPIKVPLLL	"++++"
148	VPDGVSKVL	"++"
149	YPLTGDTRL	"++"
150	KPSSKALGTSL	"++++"
151	VVHPRTLIL	"++"
152	IPSRLLAIL	"++++"
153	APAAVPSAPA	"++++"
154	GPGTRLISL	"++"
155	FPYPYAERL	"++"
156	HPQVVILSL	"++++"
157	SPSPGKDPTL	"++"
158	VPERGEPEL	"++"
159	FPAHPSLLL	"++"
160	RPAPADSAL	"++++"
161	NPYEGRVEV	"++"
162	MPMISIPRV	"++"
163	RPASSLRP	"++"
164	ISTPSEVSTPL	"++"
165	TPIAKVSEL	"++++"
166	HDPDVGSNSL	"++"
167	YPSEVEHMF	"++"
168	IPTDKLLVI	"++"
169	FPTEVTPHAF	"++"
170	SPMWHVQQL	"++++"
171	APKLFAVAF	"++++"
172	KPAHYPLIAL	"++++"
173	MVPSAGQLALF	"++"
174	VPSLQRLML	"++++"
175	HPIETLVDIF	"++"
255	LPDGSRVEL	"++"
256	LPALPQQLI	"++++"

Seq ID No	Последовательность	Пептидный обмен
257	SPLRGGSSL	"++"
258	APSGTRVVQVL	"++"
259	RPAVGHSGL	"++"

Таблица 16: Показатели связывания с молекулами МНС I класса. Связывание рестриктированных по молекулам HLA I класса пептидов с HLA-B*44:02 распределено по выходу пептидного обмена: >10% = +; >20% = ++; >50 = +++; >75% = ++++

Seq ID No	Последовательность	Пептидный обмен
195	AEAVLCTLQEL	"+++"
196	AEQTGTWKL	"++"
197	EEAKQVLFL	"++"
198	FELPTGAGL	"++"
199	GEATLQRIY	"+"
200	GEELGFASL	"++"
201	GEHTSKATL	"++"
202	KEFNLQNMGL	"+++"
203	KENFAGEATL	"++"
204	KESQLPTVM	"++"
205	QEVLLQTFL	"++++"
206	SEPINIIDAL	"++"
207	TEATMTFKY	"+++"
208	AEHDAVRNAL	"+++"
209	YEVDTVLRV	"++"
210	SENIVIQVY	"++"
211	TEKEMIQKL	"++"
212	AEETCAPSV	"++"
213	TTMDQKSLW	"+"
214	AEQPDGLIL	"++"
216	LQEEKVPAIY	"+"
217	NEINEKIAPSF	"+++"
218	AEGGKVPIKW	"+++"
219	AENAEYLRV	"++"
220	KEITGFLLI	"+++"
221	AEERAEAKKKF	"++"
222	NEISTFHNL	"+++"
223	SEVPVARVW	"++++"
224	SESAVFHGF	"+++"

Seq ID No	Последовательность	Пептидный обмен
225	SEAFPSRAL	"+++"
226	EELLHGQLF	"++"
227	TEHTQSQAAW	"+++"
228	AEKQTPDGRKY	"++"
229	KESDGFHRF	"+++"
230	AENLFRAFL	"+++"
231	AEIHTAEI	"++"
232	AEKDGKLTDY	"++"
233	DESEKTTKSF	"++"
234	EEESLLTSF	"+++"
235	EEFETLKEF	"++"
236	EEKLIQDF	"++"
237	LEMPHYSTF	"++++"
238	SENPETITY	"+++"
239	TEVLDSHIHAY	"++"
240	HELENHSMY	"++"
241	REAEPKPM	"++"
260	EEAPLVTKAF	"++"
261	IEALLESSL	"++"
262	MELLLVNKL	"+++"
263	QQATPGPAY	"++"
264	DEYLIPQQGF	"+++"
265	EEVDVPIKLY	"++"
266	ARLTPIPFGL	"+"

ПРИМЕР 6:

Стабильность комплексов пептид-молекула МНС I класса

Измерение стабильности комплексов пептид-молекула МНС для пептидов HLA-B*08:01 производила компания ImmunAware (Копенгаген, Дания). Данные были получены с использованием гомогенного анализа с использованием принципа усиленного за счет эффекта близости сигнала в режиме реального времени для измерения показателей отделения пептидов от молекул HLA I класса. Сначала в E. Coli были экспрессированы человеческие рекомбинантные HLA-B*08:01 и b2m и очищены в серии стадий жидкостной хроматографии (Ferre et al., 2003; Ostergaard et al., 2001). Затем определяли стабильность комплекса пептид-МНС (pMHC) путем измерения количества b2m, ассоциированного с тяжелой цепью МНС, с течением

времени при температуре 37°C (Harndahl et al., 2012). Стабильность каждого рМНС, выраженная в виде полупериода связывания b_{2m} , ассоциированного с соответствующей тяжелой цепью, рассчитывали при помощи аппроксимации данных по уравнению для диссоциации в одну стадию.

Стабильность рМНС была измерена в трех независимых опытах, и исследуемые пептиды в отношении HLA-B*08:01, как выяснилось, находятся в диапазоне от слабого связывающего агента (+) до обеспечивающего очень стабильное связывание (++++). Средние значения полупериода ($T_{1/2}$) приведены в Таблице 17.

Таблица 17: Средние значения полупериода ($T_{1/2}$) на основе трех отдельных измерений. $T_{1/2} > 2 \text{ h} = +$; $T_{1/2} > 4 \text{ h} = ++$; $T_{1/2} > 6 \text{ h} = +++$; $T_{1/2} > 10 \text{ h} = ++++$

Seq ID No	Последовательность	Среднее значение полупериода ($T_{1/2}$)
176	AAMSRYEL	++
177	DLKYNALDL	+++
178	HAKEKLTAL	+++
180	LLKAEPLAF	++
181	YKKLRTSSF	++
182	LPFLRENDL	++
183	FQKLKLLSL	+
184	EPVKKSRL	+++
185	NPNLKTLL	++
187	YVKERSKAM	+++
189	HIFLRTTL	++
192	LPMLKVLNL	+
193	LSYNKYLQL	++
194	EAKRHLLQV	++

Список цитируемой литературы

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

Ampie, L. et al., Front Oncol. **5** (2015): 12

Andersen, R. S. et al., Nat.Protoc. **7** (2012): 891-902

Appay, V. et al., Eur.J Immunol. **36** (2006): 1805-1814

Avigan, D. et al., Clin Cancer Res. **10** (2004): 4699-4708

- Banchereau, J. et al., *Cell* **106** (2001): 271-274
- Beatty, G. et al., *J Immunol* **166** (2001): 2276-2282
- Beggs, J. D., *Nature* **275** (1978): 104-109
- Berman, R. S. et al., National Cancer Institute: PDQ(R) Colon Cancer Treatment (2015a)
- Berman, R. S. et al., National Cancer Institute: PDQ(R) Rectal Cancer Treatment (2015b)
- Boulter, J. M. et al., *Protein Eng* **16** (2003): 707-711
- Braumuller, H. et al., *Nature* (2013)
- Bray, F. et al., *Int J Cancer* **132** (2013): 1133-1145
- Brossart, P. et al., *Blood* **90** (1997): 1594-1599
- Bruckdorfer, T. et al., *Curr.Pharm.Biotechnol.* **5** (2004): 29-43
- Butterfield, L. H. et al., *Clin Cancer Res* **12** (2006): 2817-2825
- Butterfield, L. H. et al., *Clin Cancer Res* **9** (2003): 5902-5908
- Card, K. F. et al., *Cancer Immunol Immunother.* **53** (2004): 345-357
- Chang, Y. S. et al., *Cancer Chemother.Pharmacol.* **59** (2007): 561-574
- Chapiro, J. et al., *Radiol.Med.* **119** (2014): 476-482
- Cohen, C. J. et al., *J Mol Recognit.* **16** (2003a): 324-332
- Cohen, C. J. et al., *J Immunol* **170** (2003b): 4349-4361
- Cohen, S. N. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **69** (1972): 2110-2114
- Coligan, J. E. et al., *Current Protocols in Protein Science* (1995)
- Colombetti, S. et al., *J Immunol.* **176** (2006): 2730-2738
- Dengjel, J. et al., *Clin Cancer Res* **12** (2006): 4163-4170
- Denkberg, G. et al., *J Immunol* **171** (2003): 2197-2207
- Enguita-German, M. et al., *World J Hepatol.* **6** (2014): 716-737
- Falk, K. et al., *Nature* **351** (1991): 290-296
- Ferlay et al., *GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No.11 [Internet]*, (2013), <http://globocan.iarc.fr>

- Ferre, H. et al., Protein Sci. **12** (2003): 551-559
- Follenzi, A. et al., Nat Genet. **25** (2000): 217-222
- Fong, L. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **98** (2001): 8809-8814
- Gabrilovich, D. I. et al., Nat Med. **2** (1996): 1096-1103
- Gattinoni, L. et al., Nat Rev.Immunol **6** (2006): 383-393
- Gnjatic, S. et al., Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A **100** (2003): 8862-8867
- Godkin, A. et al., Int.Immunol **9** (1997): 905-911
- Gragert, L. et al., Hum.Immunol. **74** (2013): 1313-1320
- Green, M. R. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual **4th** (2012)
- Greenfield, E. A., Antibodies: A Laboratory Manual **2nd** (2014)
- Gustafsson, C. et al., Trends Biotechnol. **22** (2004): 346-353
- Harndahl, M. et al., Eur.J Immunol. **42** (2012): 1405-1416
- Holtl, L. et al., Clin.Cancer Res. **8** (2002): 3369-3376
- Horig, H. et al., Cancer Immunol Immunother. **49** (2000): 504-514
- Hwang, M. L. et al., J Immunol. **179** (2007): 5829-5838
- Jung, G. et al., Proc Natl Acad Sci U S A **84** (1987): 4611-4615
- Kaufman, H. L. et al., Clin Cancer Res **14** (2008): 4843-4849
- Kibbe, A. H., Handbook of Pharmaceutical Excipients **rd** (2000)
- Koido, S. et al., World J Gastroenterol. **19** (2013): 8531-8542
- Krieg, A. M., Nat Rev.Drug Discov. **5** (2006): 471-484
- Kuball, J. et al., Blood **109** (2007): 2331-2338
- Lee, W. C. et al., J Immunother. **28** (2005): 496-504
- Leitlinie Magenkarzinom, **032-009OL**, (2012)
- Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, **030/099**, (2014)
- Liddy, N. et al., Nat Med. **18** (2012): 980-987

- Ljunggren, H. G. et al., J Exp.Med. **162** (1985): 1745-1759
- Llovet, J. M. et al., N.Engl.J Med. **359** (2008): 378-390
- Longenecker, B. M. et al., Ann N.Y.Acad.Sci. **690** (1993): 276-291
- Lukas, T. J. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **78** (1981): 2791-2795
- Lundblad, R. L., Chemical Reagents for Protein Modification **3rd** (2004)
- Marten, A. et al., Cancer Immunol.Immunother. **51** (2002): 637-644
- Massari, F. et al., Cancer Treat.Rev. **41** (2015): 114-121
- Matsueda, S. et al., World J Gastroenterol. **20** (2014): 1657-1666
- Meziere, C. et al., J Immunol **159** (1997): 3230-3237
- Miyagi, Y. et al., Clin Cancer Res **7** (2001): 3950-3962
- Morgan, R. A. et al., Science **314** (2006): 126-129
- Mortara, L. et al., Clin Cancer Res. **12** (2006): 3435-3443
- Moulton, H. M. et al., Clin Cancer Res **8** (2002): 2044-2051
- Mumberg, D. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **96** (1999): 8633-8638
- Okuno, K. et al., Exp.Ther Med. **2** (2011): 73-79
- Ostergaard, Pedersen L. et al., Eur.J Immunol. **31** (2001): 2986-2996
- Palmer, D. H. et al., Hepatology **49** (2009): 124-132
- Plebanski, M. et al., Eur.J Immunol **25** (1995): 1783-1787
- Porta, C. et al., Virology **202** (1994): 949-955
- Rammensee, H. et al., Immunogenetics **50** (1999): 213-219
- Reinisch, W. et al., J Immunother. **25** (2002): 489-499
- Rini, B. I. et al., Curr.Opin.Oncol. **20** (2008): 300-306
- Rini, B. I. et al., Cancer **107** (2006): 67-74
- Rock, K. L. et al., Science **249** (1990): 918-921
- Rodenko, B. et al., Nat Protoc. **1** (2006): 1120-1132

- Saiki, R. K. et al., *Science* **239** (1988): 487-491
- Sangro, B. et al., *J Clin Oncol* **22** (2004): 1389-1397
- Schmitt, T. M. et al., *Hum. Gene Ther.* **20** (2009): 1240-1248
- Scholten, K. B. et al., *Clin Immunol.* **119** (2006): 135-145
- Seeger, F. H. et al., *Immunogenetics* **49** (1999): 571-576
- Sherman, F. et al., *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics* (1986)
- Shi, M. et al., *World J Gastroenterol.* **10** (2004): 1146-1151
- Singh-Jasuja, H. et al., *Cancer Immunol. Immunother.* **53** (2004): 187-195
- Small, E. J. et al., *J Clin Oncol.* **24** (2006): 3089-3094
- Stintzing, S., *F1000Prime.Rep.* **6** (2014): 108
- Su, Z. et al., *Cancer Res.* **63** (2003): 2127-2133
- Takayama, T. et al., *Cancer* **68** (1991): 2391-2396
- Takayama, T. et al., *Lancet* **356** (2000): 802-807
- Teufel, R. et al., *Cell Mol Life Sci.* **62** (2005): 1755-1762
- Thakkar, J. P. et al., *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **23** (2014): 1985-1996
- Tran, E. et al., *Science* **344** (2014): 641-645
- Walter, S. et al., *J Immunol* **171** (2003): 4974-4978
- Walter, S. et al., *Nat Med.* **18** (2012): 1254-1261
- Wilhelm, S. M. et al., *Cancer Res* **64** (2004): 7099-7109
- Willcox, B. E. et al., *Protein Sci.* **8** (1999): 2418-2423
- Wilson, P. M. et al., *Nat Rev. Clin Oncol* **11** (2014): 282-298
- Wittig, B. et al., *Hum. Gene Ther.* **12** (2001): 267-278
- Zaremba, S. et al., *Cancer Res.* **57** (1997): 4570-4577
- Zufferey, R. et al., *J Virol.* **73** (1999): 2886-2892

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептид, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы последовательностей, состоящей из SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 268 и вариантыные последовательности, которые по меньшей мере на 88% гомологичны последовательностям с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 268, и где указанный вариант связывается с молекулой(ами) главного комплекса гистосовместимости МНС и/или индуцирует перекрестную реакцию Т-клеток с указанным вариантным пептидом; и его фармацевтически приемлемая соль, где указанный пептид не является полипептидом полной длины.
2. Пептид в соответствии с п. 1, где указанный пептид имеет способность связываться с молекулой МНС I или II класса, и где указанный пептид, когда он связан с указанной молекулой МНС, в состоянии распознаваться Т-клетками CD4 и/или CD8.
3. Пептид или его вариант в соответствии с п. 1 или 2, где его аминокислотная последовательность включает непрерывный фрагмент аминокислот в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 268.
4. Пептид или его вариант в соответствии с любым из пп. 1–3, где указанный пептид или его вариант имеет общую длину от 8 до 100, предпочтительно от 8 до 30, и более предпочтительно от 8 до 16 аминокислот, и, наиболее предпочтительно, где пептид состоит или состоит по существу из аминокислотной последовательности в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 268.
5. Пептид или его вариант в соответствии с любым из пп. 1–4, где указанный пептид модифицирован и/или включает непептидные связи.

6. Пептид или его вариант в соответствии с любым из пп. 1–5, где указанный пептид является частью слитого белка, в частности, включающим N-терминальные аминокислоты антиген-ассоциированной инвариантной цепи (Ii) HLA-DR.
7. Антитело, в частности растворимое или связанное с мембраной антитело, предпочтительно моноклональное антитело или его фрагмент, которое специфически распознает пептид или его вариант в соответствии с любым из пп. 1–5, предпочтительно пептид или его вариант в соответствии с любым из пп. 1–5, когда он связан с молекулой МНС.
8. Т-клеточный рецептор, предпочтительно растворимый или связанный с мембраной, или его фрагмент, который реагирует с HLA-лигандом, причем указанный лиганд является пептидом или его вариантом в соответствии с любым из пп. 1–5, предпочтительно пептидом или его вариантом в соответствии с любым из пп. 1–5, когда он связан с молекулой МНС.
9. Т-клеточный рецептор в соответствии с п. 8, где указанная аминокислотная последовательность лиганда по меньшей мере на 88% идентична любой из последовательностей с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 268, или где аминокислотная последовательность указанного лиганда состоит из любой из последовательностей с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 268.
10. Т-клеточный рецептор в соответствии с п. 8 или п. 9, где указанный Т-клеточный рецептор представлен в виде растворимой молекулы и, факультативно, обладает дополнительной эффекторной функцией, например, несет иммуностимулирующий домен или токсин.
11. Аптамер, который специфически распознает пептид или его вариант в соответствии с любым из пп. 1–5, предпочтительно пептид или его вариант в соответствии с любым из пп. 1–5, который связан с молекулой МНС.

12. Нуклеиновая кислота, кодирующая пептид или его вариант в соответствии с любым из пп. 1–5, антитело или его фрагмент в соответствии с п. 7, Т-клеточный рецептор или его фрагмент в соответствии с п. 8 или п. 9, факультативно связанная с гетерологичной последовательностью промотора, или вектор экспрессии, экспрессирующий указанную нуклеиновую кислоту.
13. Рекомбинантная клетка-хозяин, включающая пептид в соответствии с любым из пп. 1–6, антитело или его фрагмент в соответствии с п. 7, Т-клеточный рецептор или его фрагмент в соответствии с п. 8 или п. 9 или нуклеиновую кислоту или вектор экспрессии в соответствии с п. 12, где указанная клетка-хозяин предпочтительно является антигенпрезентирующей клеткой, такой как дендритная клетка, Т-клетка или НК-клетка.
14. Способ получения активированных Т-лимфоцитов *in vitro*, где способ включает контактирование Т-клеток *in vitro* с нагруженными антигеном молекулами МНС человека I или II класса, экспрессированными на поверхности подходящей антигенпрезентирующей клетки или искусственной конструкции, имитирующей антигенпрезентирующую клетку, на период времени, достаточного для активации указанных Т-клеток антиген-специфическим образом, где указанный антиген является пептидом в соответствии с любым из пп. 1–4.
15. Активированный Т-лимфоцит, полученный с помощью способа в соответствии с п. 14, который селективно распознает клетку, которая презентует полипептид, включающий аминокислотную последовательность, данную в любом из пп. 1–4.
16. Фармацевтическая композиция, включающая по меньшей мере один активный ингредиент, выбранный из группы, состоящей из пептида в соответствии с любым из пп. 1–6, антитела или его фрагмента в соответствии с п. 7, Т-клеточного рецептора или его фрагмента в соответствии с п. 8 или п. 9,

аптамера в соответствии с п. 11, нуклеиновой кислоты или вектора экспрессии в соответствии с п. 12, клетки-хозяина в соответствии с п. 13 или активированного Т-лимфоцита в соответствии с п. 15 или конъюгированного или меченного активного ингредиента и фармацевтически приемлемого носителя, и факультативно фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ и/или стабилизаторов.

17. Способ получения пептида или его варианта в соответствии с любым из пп. 1–6, антитела или его фрагмента в соответствии с п. 7 или Т-клеточного рецептора или его фрагмента в соответствии с п. 8 или п. 9, причем способ включает культивацию клетки-хозяина в соответствии с п. 13 и выделение пептида или его варианта, антитела или его фрагмента или Т-клеточного рецептора или его фрагмента из указанной клетки-хозяина и/или ее культуральной среды.
18. Пептид в соответствии с любым из пп. 1–6, антитело или его фрагмент в соответствии с п. 7, Т-клеточный рецептор или его фрагмент в соответствии с п. 8 или п. 9, аптамер в соответствии с п. 11, нуклеиновая кислота или вектор экспрессии в соответствии с п. 12, клетка-хозяин в соответствии с п. 13 или активированный Т-лимфоцит в соответствии с п. 15 для применения в медицине.
19. Способ уничтожения клеток-мишеней у пациента, чьи клетки-мишени презентируют полипептид, включающий аминокислотную последовательность, данную в любом из пп. 1–4, где способ включает введение пациенту эффективного числа активированных Т-клеток, как определено в п. 15.
20. Пептид в соответствии с любым из пп. 1–6, антитело или его фрагмент в соответствии с п. 7, Т-клеточный рецептор или его фрагмент в соответствии с п. 8 или п. 9, аптамер в соответствии с п. 11, нуклеиновая кислота или вектор экспрессии в соответствии с п. 12, клетка-хозяин в соответствии с п. 13 или

активированный Т-лимфоцит в соответствии с п. 15 для применения в диагностике и/или лечении рака или для применения в производстве медикамента против рака.

21. Применение в соответствии с п. 20, где указанное раковое заболевание выбрано из группы: колоректальный рак, глиобластома, рак желудка, гепатоклеточная карцинома, почечноклеточная карцинома, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз и острый миелоидный лейкоз и другие лимфоидные новообразования, например, неходжкинская лимфома, пост-трансплантационные лимфопролиферативные заболевания (PTLD), а также другие миелоидные новообразования, такие как первичный миелофиброз, эссенциальная тромбоцитемия, истинная полицитемия, а также другие новообразования, такие как рак пищевода, немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, меланوما, рак молочной железы, рак желчного пузыря и холангиокарцинома, рак мочевого пузыря, рак матки, плоскоклеточная карцинома головы и шеи, мезотелиома, и других опухолей, которые демонстрируют избыточную экспрессию белка, из которого получен пептид с последовательностями с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 268.
22. Комплект, включающий:
- (а) контейнер, включающий фармацевтическую композицию, содержащую пептид(ы) или вариант в соответствии с любым из пп. 1–6, антитело или его фрагмент в соответствии с п. 7, Т-клеточный рецептор или его фрагмент в соответствии с п. 8 или п. 9, аптамер в соответствии с п. 11, нуклеиновую кислоту или вектор экспрессии в соответствии с п. 12, клетку-хозяина в соответствии с п. 13 или активированный Т-лимфоцит в соответствии с п. 15 в виде раствора или в лиофилизированной форме;
 - (б) факультативно – второй контейнер, содержащий разбавитель или восстанавливающий раствор для лиофилизированного состава;

- (в) факультативно – по меньшей мере еще один пептид, выбранный из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 268, и
- (г) факультативно – инструкции по (i) применению раствора или (ii) восстановлению и/или по применению лиофилизированного состава.
23. Комплект в соответствии с п. 22, дополнительно включающий один или более (iii) буферов, (iv) разбавителей, (v) фильтров, (vi) игл или (v) шприцев.
24. Способ получения персонализированной противораковой вакцины или медикаментозной и/или клеточной терапии для отдельного пациента, где указанный способ включает:
- а) идентификацию опухолеассоциированных пептидов (TUMAP), презентруемых опухолевым образцом указанного отдельного пациента;
- б) сравнение пептидов, идентифицированных на этапе а), с хранилищем пептидов, которые предварительно прошли скрининг на иммуногенность и/или избыточную презентацию в опухолях по сравнению с нормальными тканями;
- в) выбор по меньшей мере одного пептида из хранилища, который соответствует пептиду TUMAP, идентифицированному у пациента; и
- г) производство и/или приготовление лекарственной формы персонализированной вакцины или препарата для медикаментозной или клеточной терапии на основании этапа в).
25. Способ в соответствии с п. 24, где указанные пептиды TUMAP идентифицируют с помощью:
- а1) сравнения данных по экспрессии в опухолевом образце с данными образца нормальной ткани, соответствующей типу ткани опухолевого образца, для идентификации белков, которые в опухолевом образце экспрессируются в избытке или аберрантно; и
- а2) установление корреляции между данными экспрессии и последовательностями лигандов МНС, связанных с молекулами МНС I и/или

II класса в опухолевом образце, в целях идентификации лигандов МНС, которые получены из белков, избыточно или aberrантно экспрессируемых опухолью.

26. Способ в соответствии с п. 24 или п. 25, где последовательности лигандов МНС идентифицируют с помощью элюирования связанных пептидов из молекул МНС, выделенных из опухолевого образца, и секвенирования элюированных лигандов.
27. Способ в соответствии с любым из пп. 24–26, где нормальную ткань, соответствующую типу ткани опухолевого образца, получают у одного и того же пациента.
28. Способ в соответствии с любым из пп. 24–27, где пептиды, включенные в хранилище, идентифицируют на основании следующих этапов:
 - аа. Проведение анализа экспрессии информационной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) всего генома с помощью методов с высокой степенью параллелизма, таких как выявление профилей экспрессии на основе микрочипов или секвенирования, включающих идентификацию генов, которые в избытке экспрессируются в злокачественной ткани по сравнению с нормальной тканью или тканями;
 - аб. Выбор пептидов, которые кодируются генами, экспрессируемыми селективно или в избытке, как было обнаружено на этапе аа, и
 - ав. Определение индукции *in vivo* Т-клеточных ответов выбранными пептидами, включая анализ иммуногенности *in vitro* при использовании человеческих Т-клеток здоровых доноров или указанного пациента; или
 - ба. Идентификация HLA-лигандов из указанного опухолевого образца с помощью масс-спектрометрии;
 - бб. Проведение анализа экспрессии информационной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) всего генома с помощью методов с высокой степенью параллелизма, таких как выявление профилей экспрессии на основе

микрочипов или секвенирования, включающих идентификацию генов, которые в избытке экспрессируются в злокачественной ткани по сравнению с нормальной тканью или тканями;

бв. Сравнение идентифицированных HLA-лигандов с данными экспрессии указанных генов;

бг. Выбор пептидов, которые кодируются генами, экспрессируемыми селективно или в избытке, обнаруженными на этапе бв.;

бд. Повторное обнаружение отобранных пептидов TUMAP этапа бг. на опухолевой ткани и нечастое обнаружение или их отсутствие на здоровых тканях и подтверждение релевантности избыточной экспрессии на уровне мРНК; и

бе. Определение индукции *in vivo* Т-клеточных ответов выбранными пептидами, включая анализы иммуногенности *in vitro* при использовании человеческих Т-клеток здоровых доноров или указанного пациента.

29. Способ в соответствии с любым из пп. 24–28, где иммуногенность пептидов, включенных в хранилище, определяют способом, включающим анализ иммуногенности *in vitro*, контроль иммунного статуса пациента на наличие связывания отдельных пептидов с молекулами HLA, окрашивание МНС-мультимерами, анализ методом ELISPOT и/или внутриклеточное окрашивание цитокинов.
30. Способ в соответствии с любым из пп. 24–29, где указанное хранилище включает множество пептидов, выбранных из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID No 1 по SEQ ID No 268.
31. Способ в соответствии с любым из пп. 24–30, дополнительно включающий идентификацию по меньшей мере одной мутации, являющейся уникальной для опухолевого образца по сравнению с нормальной соответствующей тканью отдельного пациента, и выбор пептида, который коррелирует с

мутацией, для включения в вакцину или получения средств клеточной терапии.

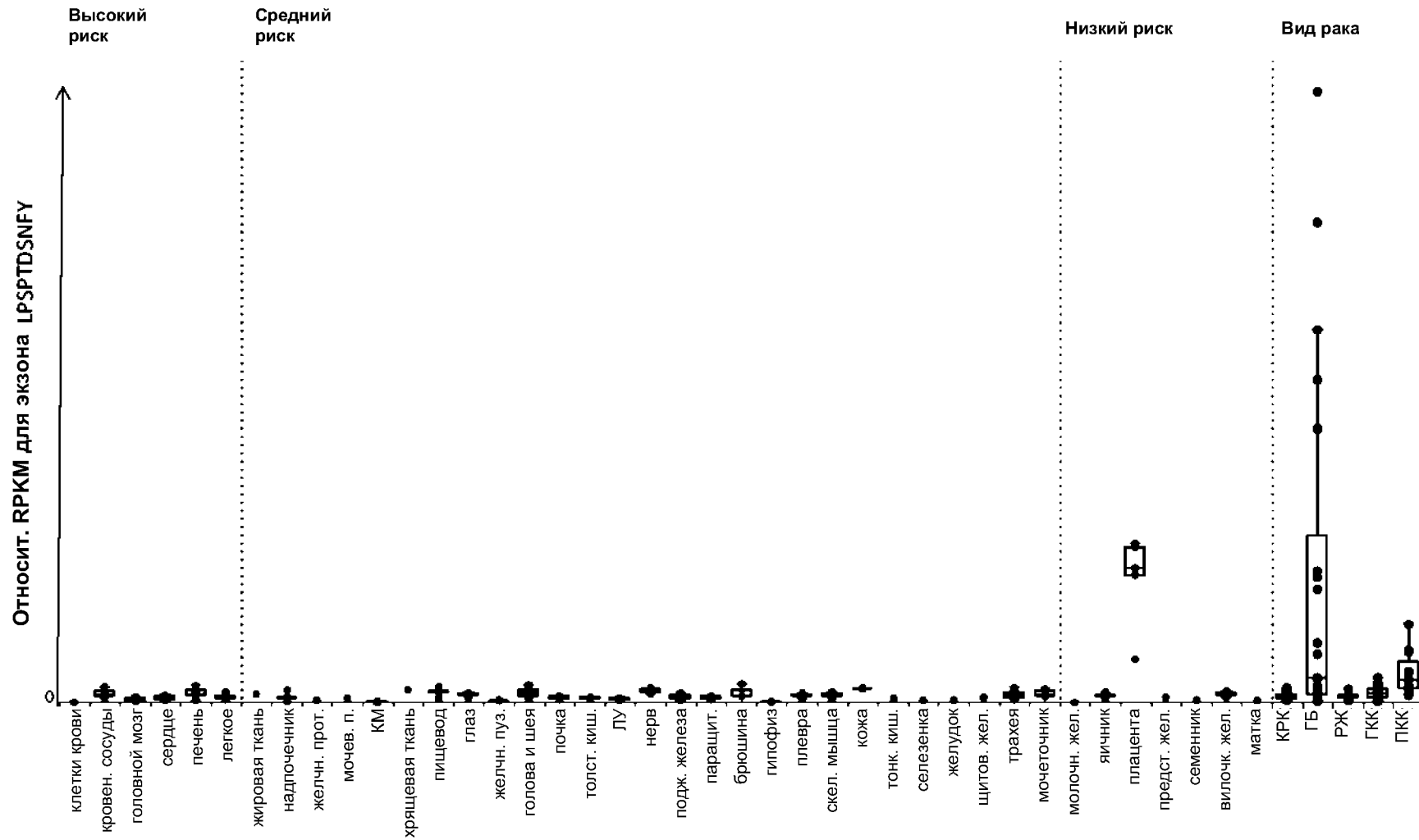
32. Способ в соответствии с п. 31, где указанную по меньшей мере одну мутацию идентифицируют методом полногеномного секвенирования.

Фигура 1А

Ген: EGFR

Пептид: LPSPTDSNFY

SEQ ID No: 2

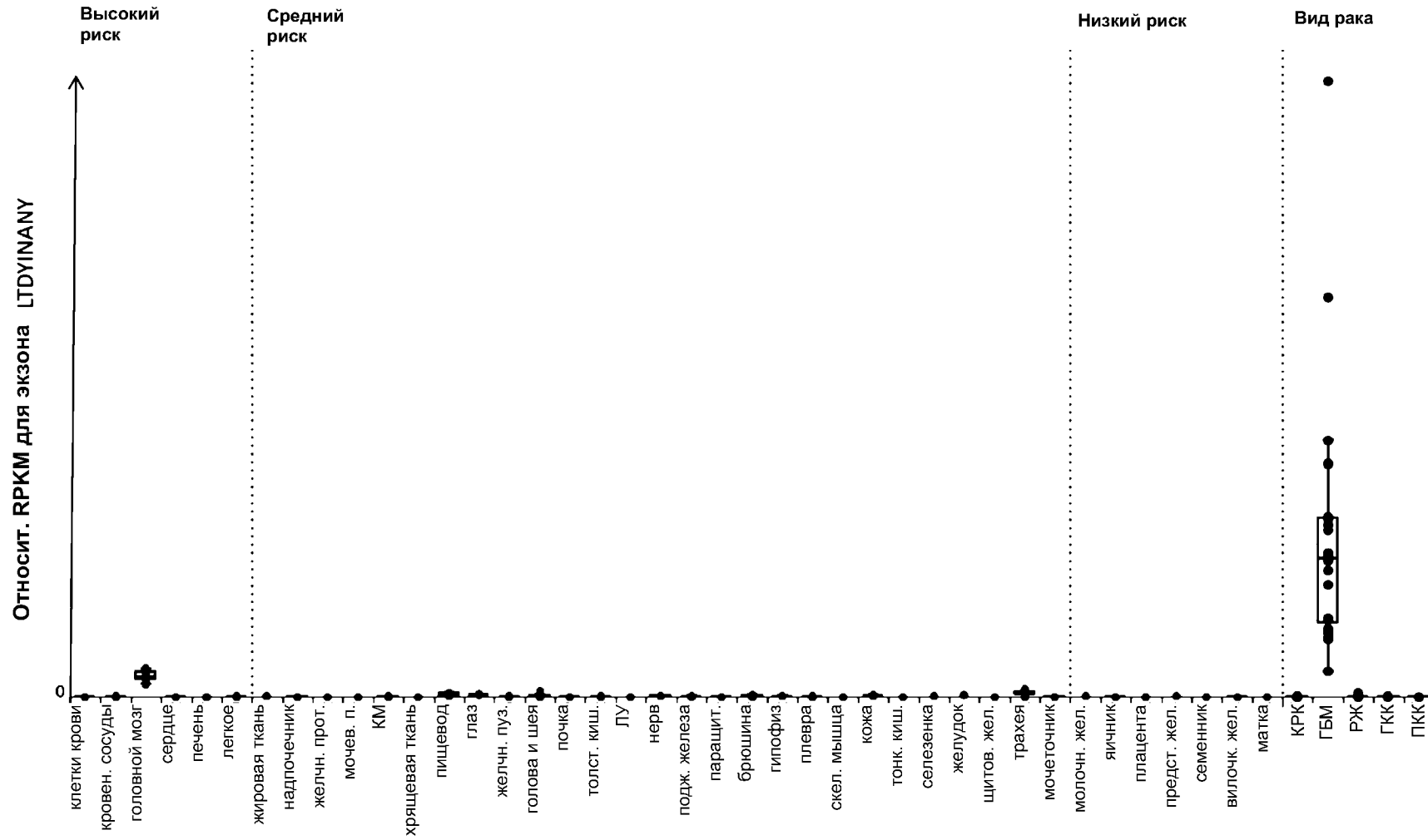


Фигура 1В

Ген: PTPRZ1

Пептид: LTDYINANY

SEQ ID No: 28

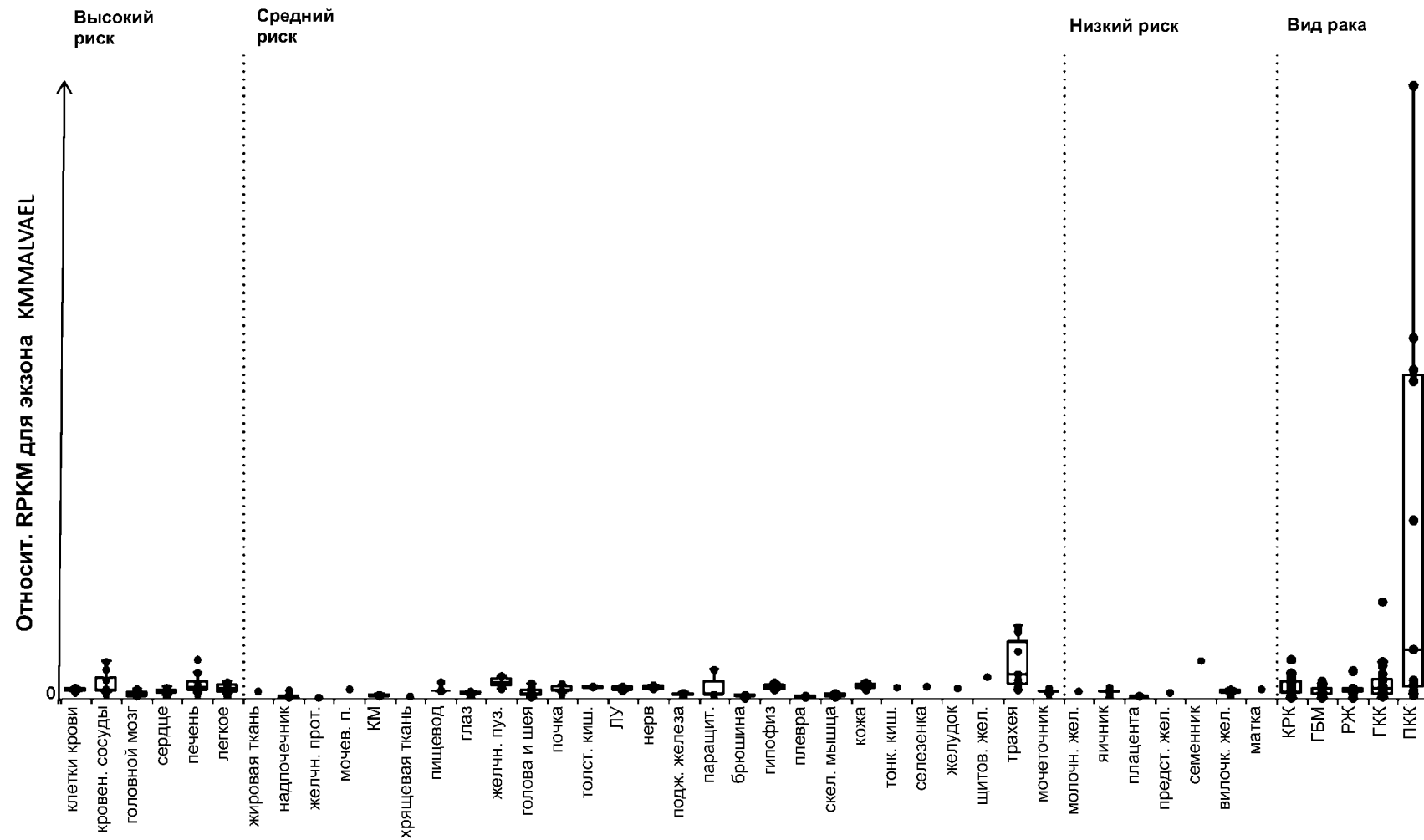


Фигура 1С

Ген: CCDC146

Пептид: KMMALVAEL

SEQ ID No: 42

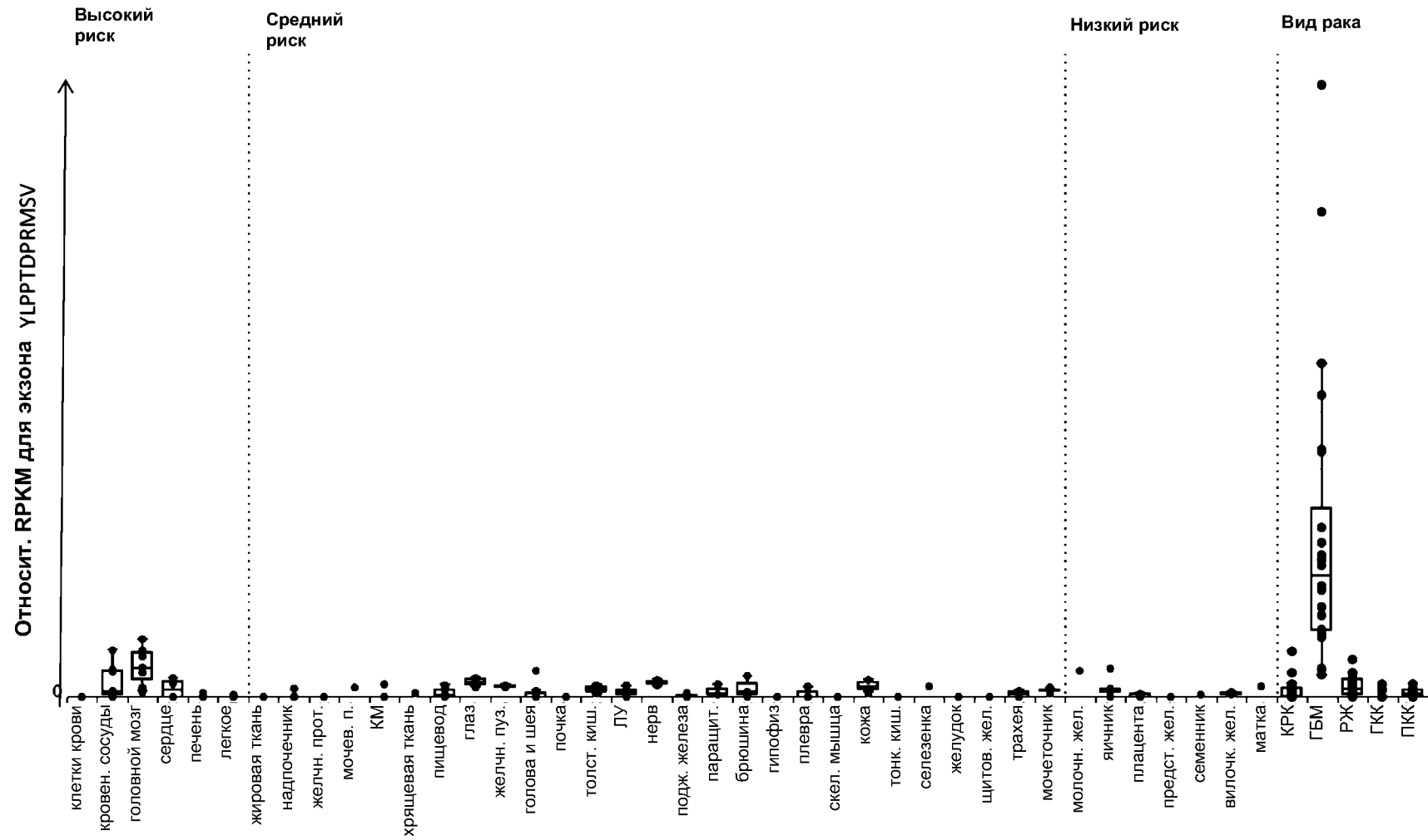


Фигура 1D

Ген: MMP16

Пептид: YLPPTDPRMSV

SEQ ID No: 54

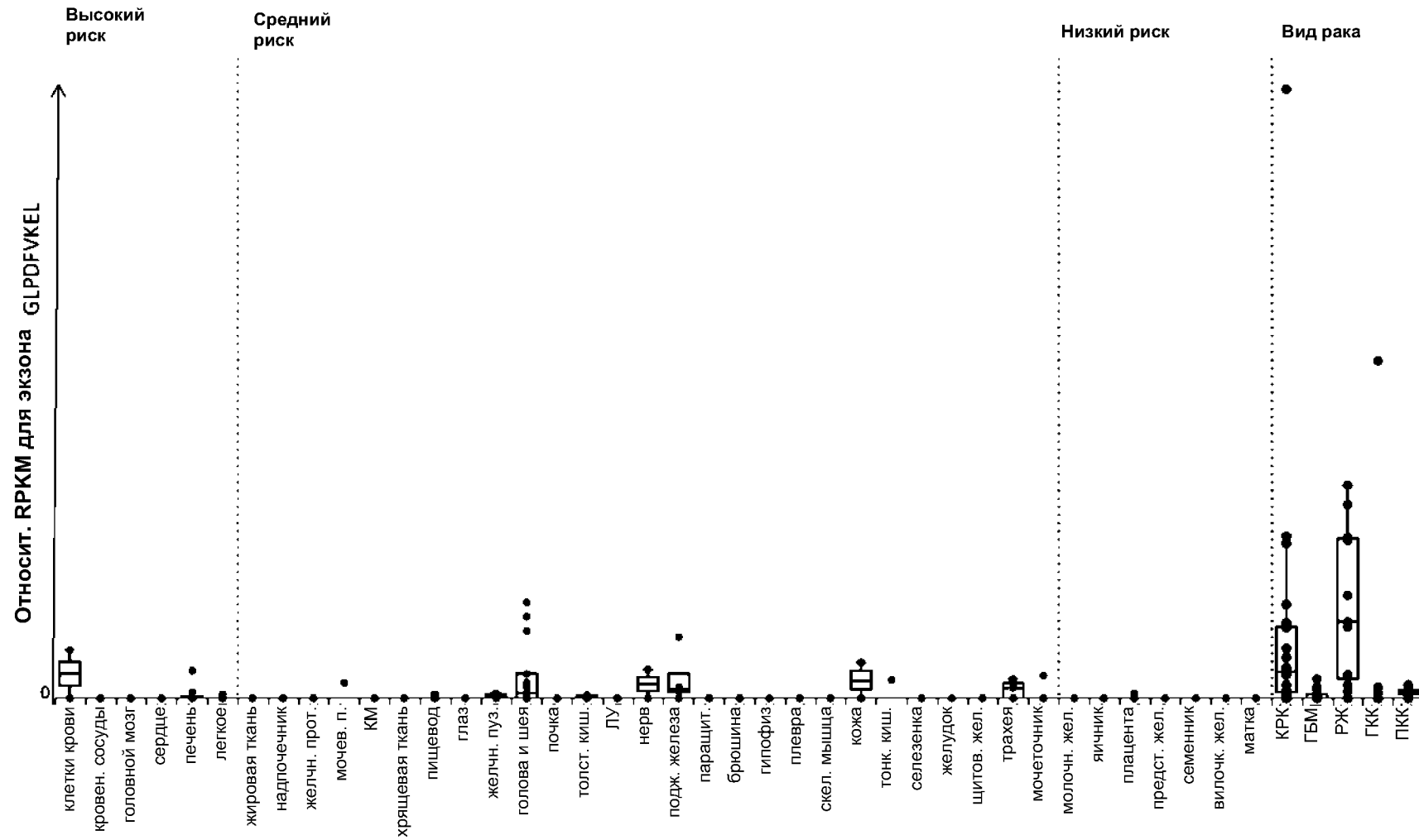


Фигура 1Е

Ген: RP11-1220K2.2

Пептид: GLPDFVKEL

SEQ ID No: 60

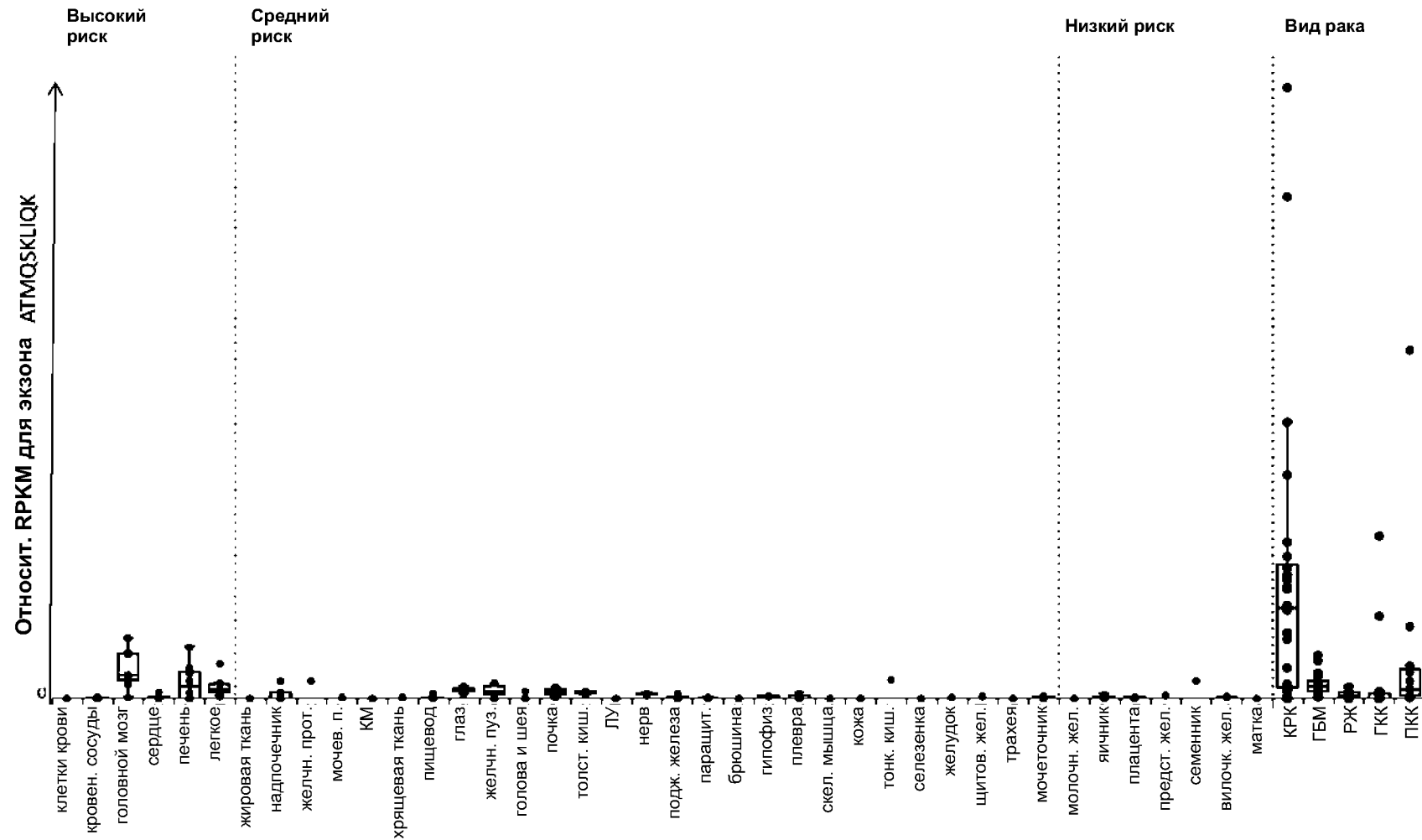


Фигура 1F

Ген: GRM8

Пептид: ATMQSKLIQK

SEQ ID No: 99

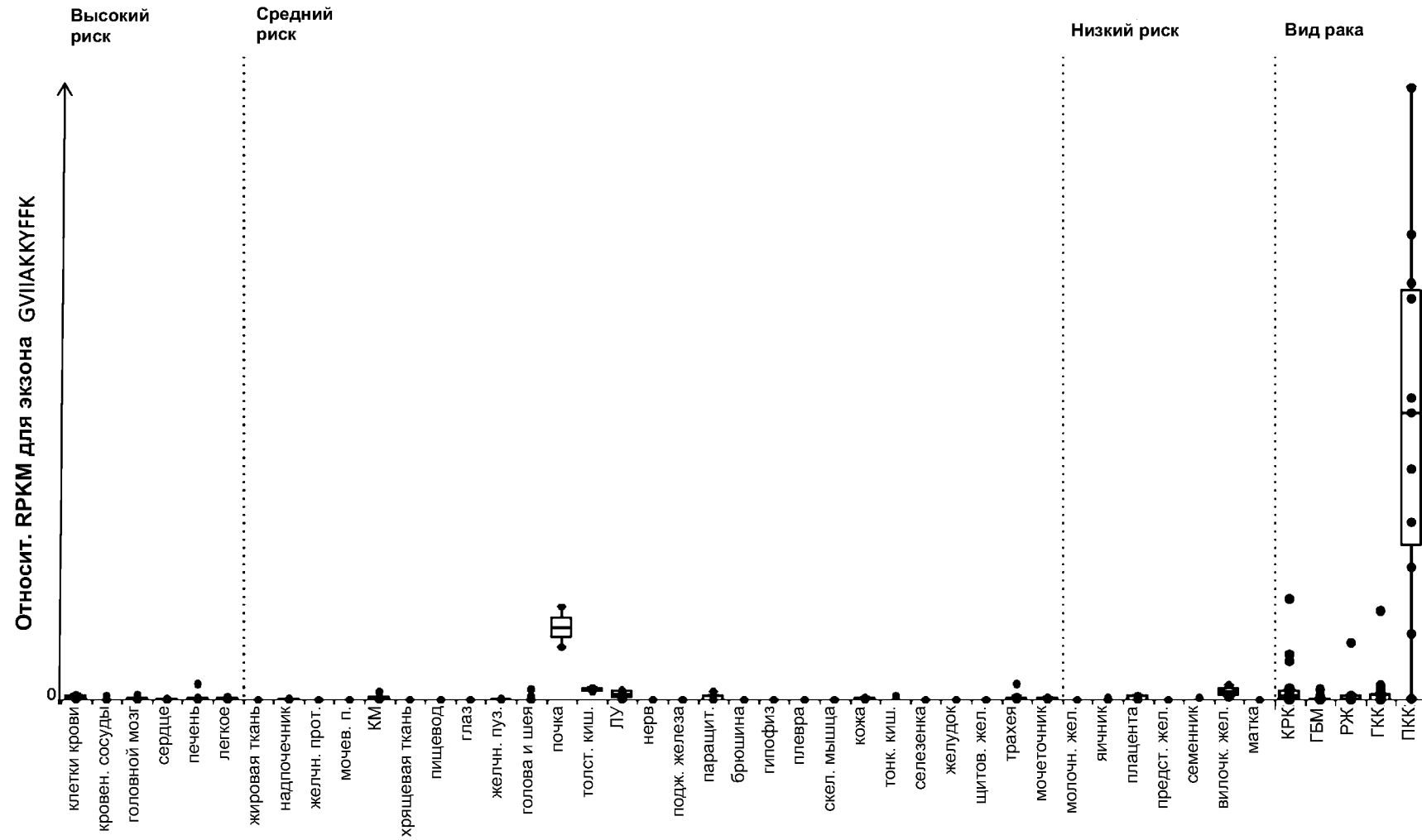


Фигура 1G

Ген: HAVCR1

Пептид: GVIIAKKYFFK

SEQ ID No: 101

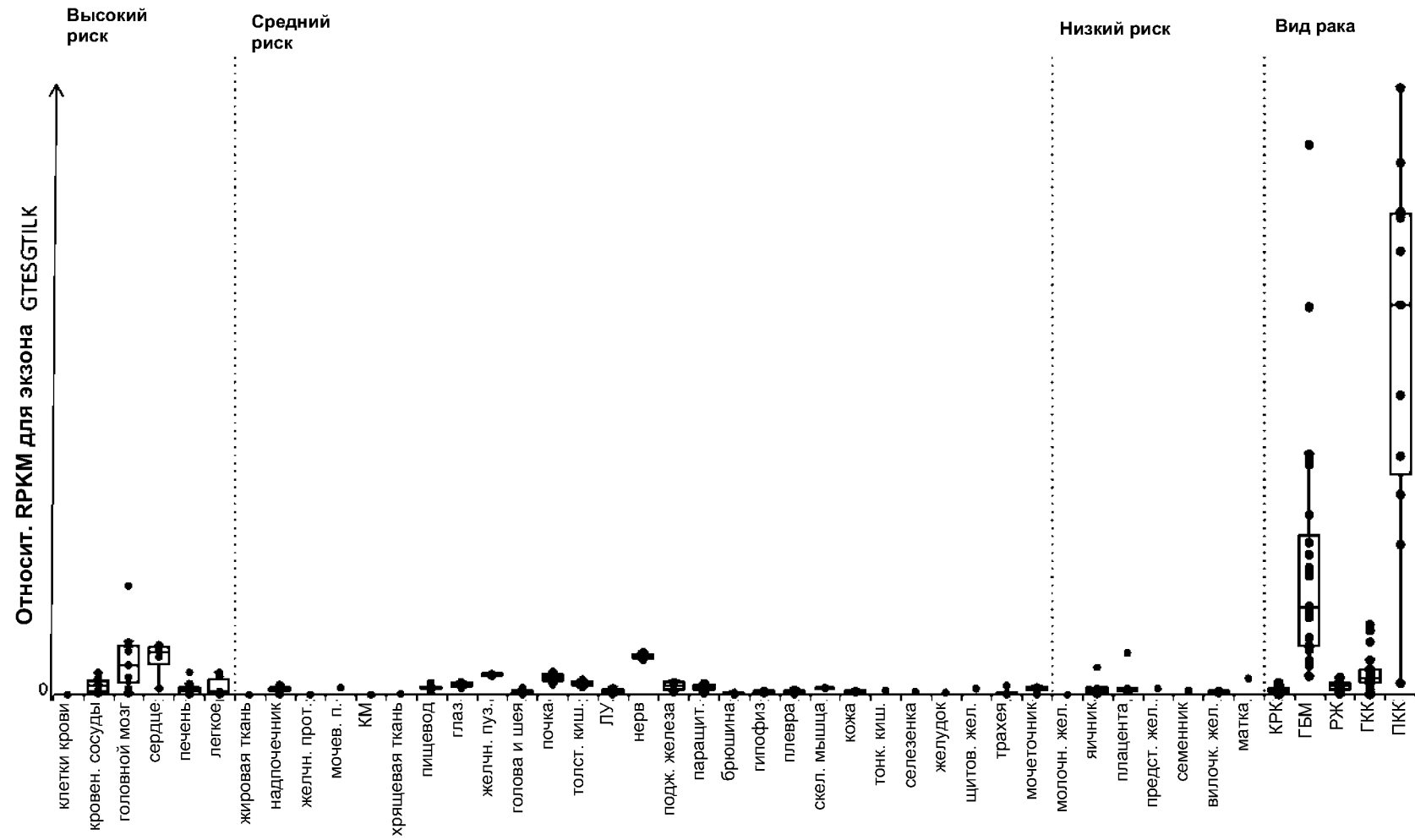


Фигура 1Н

Ген: SEMA5B

Пептид: GTESGTILK

SEQ ID No: 110

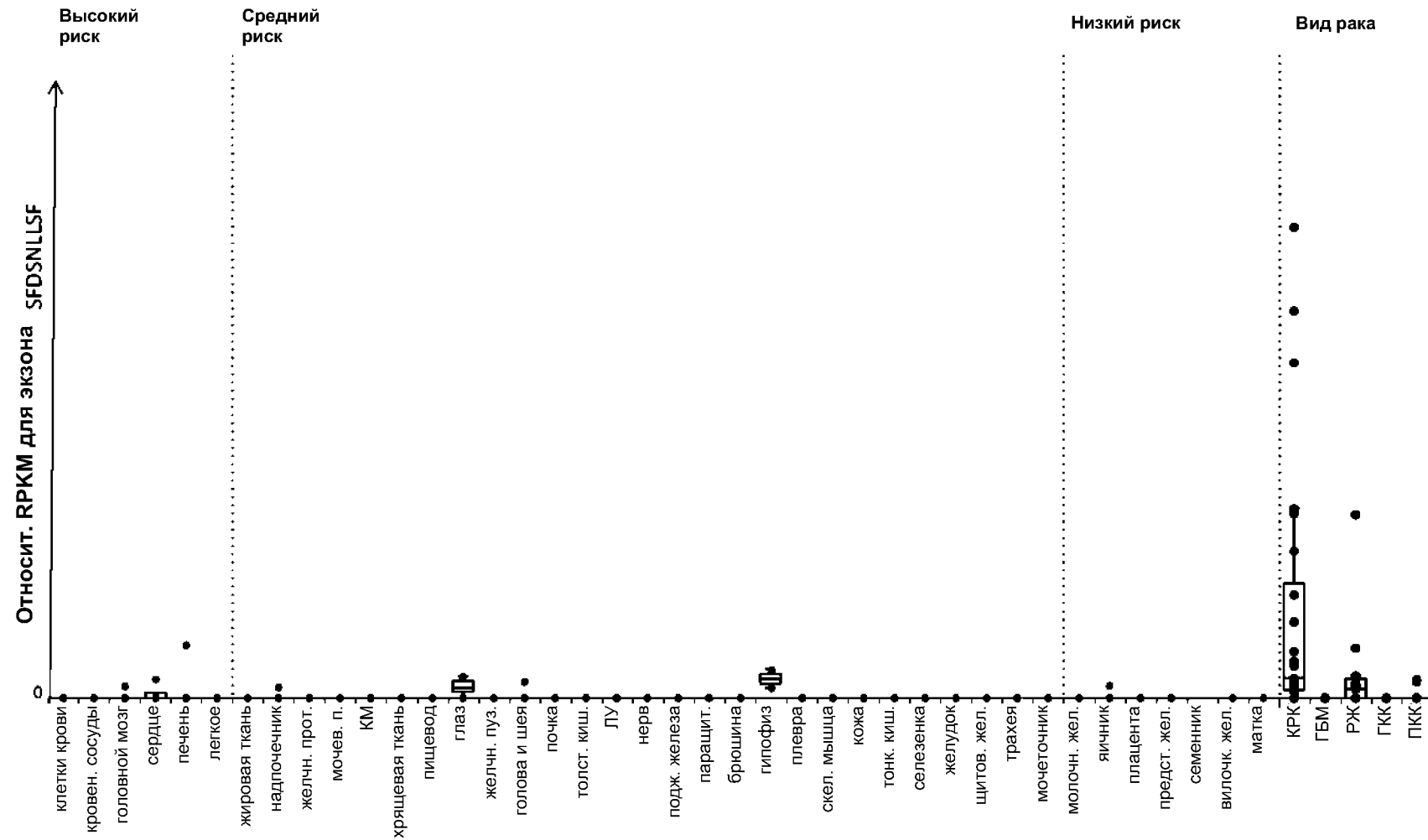


Фигура 11

Ген: PIWIL1

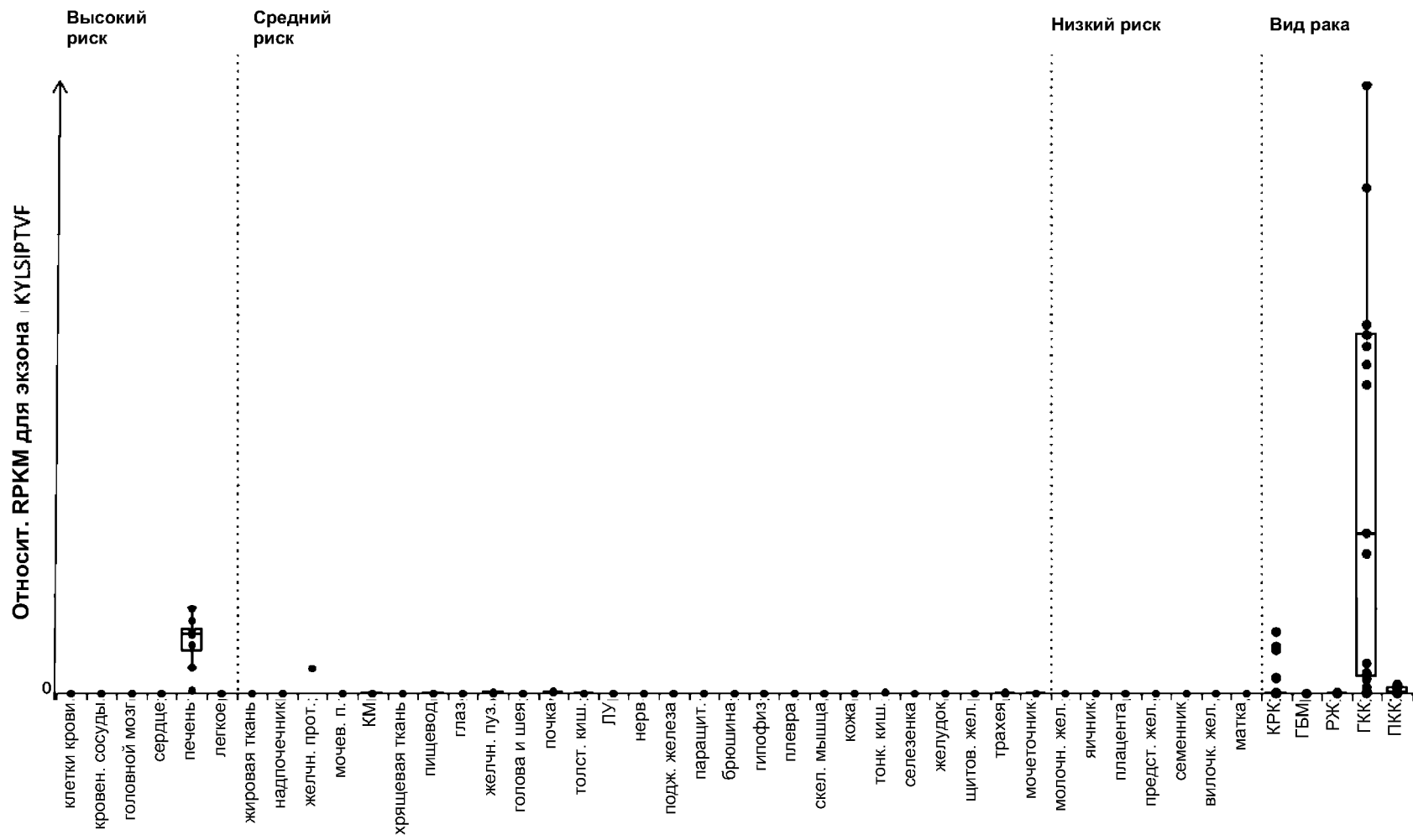
Пептид: SFDSNLLSF

SEQ ID No: 133



Фигура 1J

Ген: UGT1A3
Пептид: KYLSIPTVF
SEQ ID No: 138

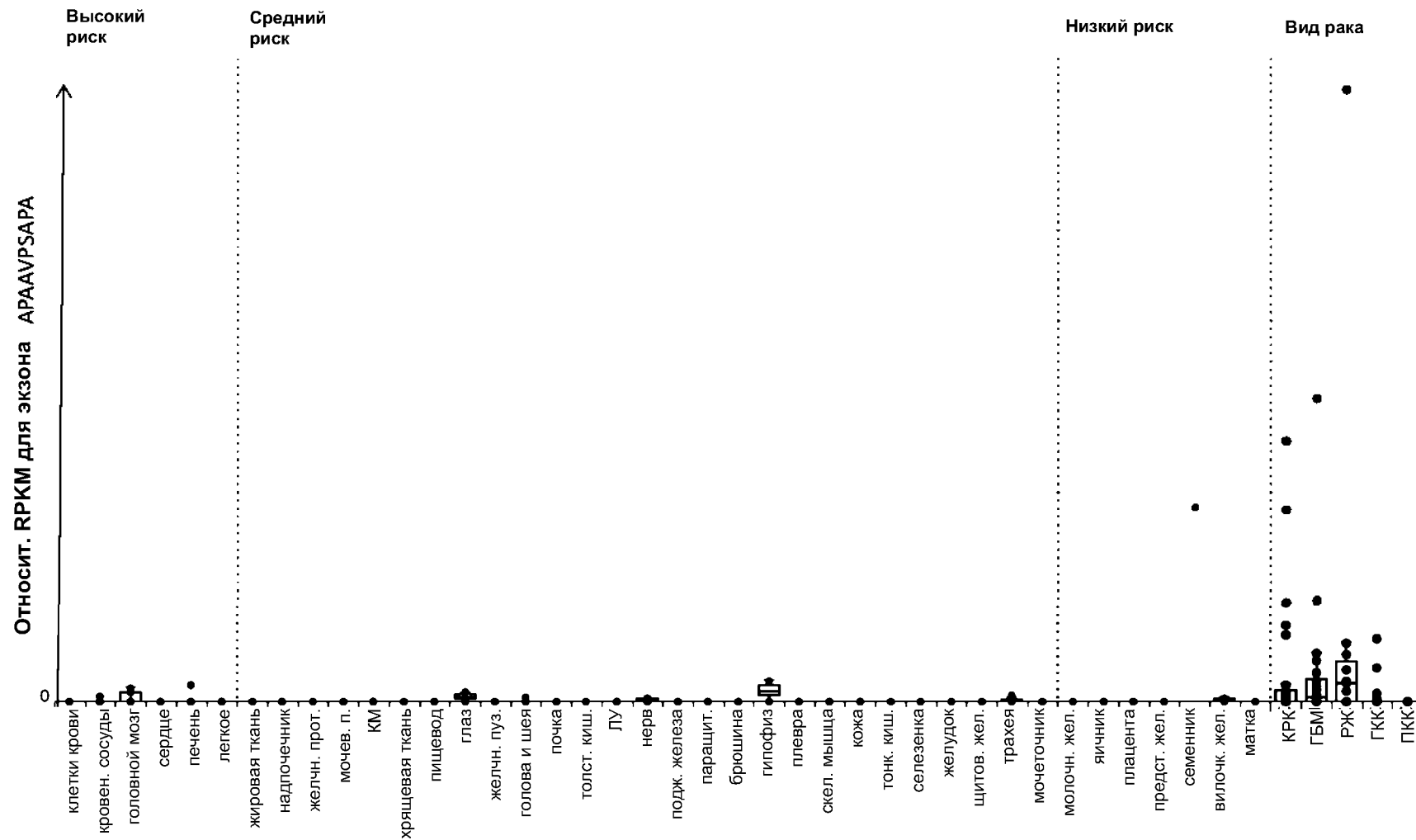


Фигура 1К

Ген: FEZF1

Пептид: ARAAVPSARA

SEQ ID No: 153

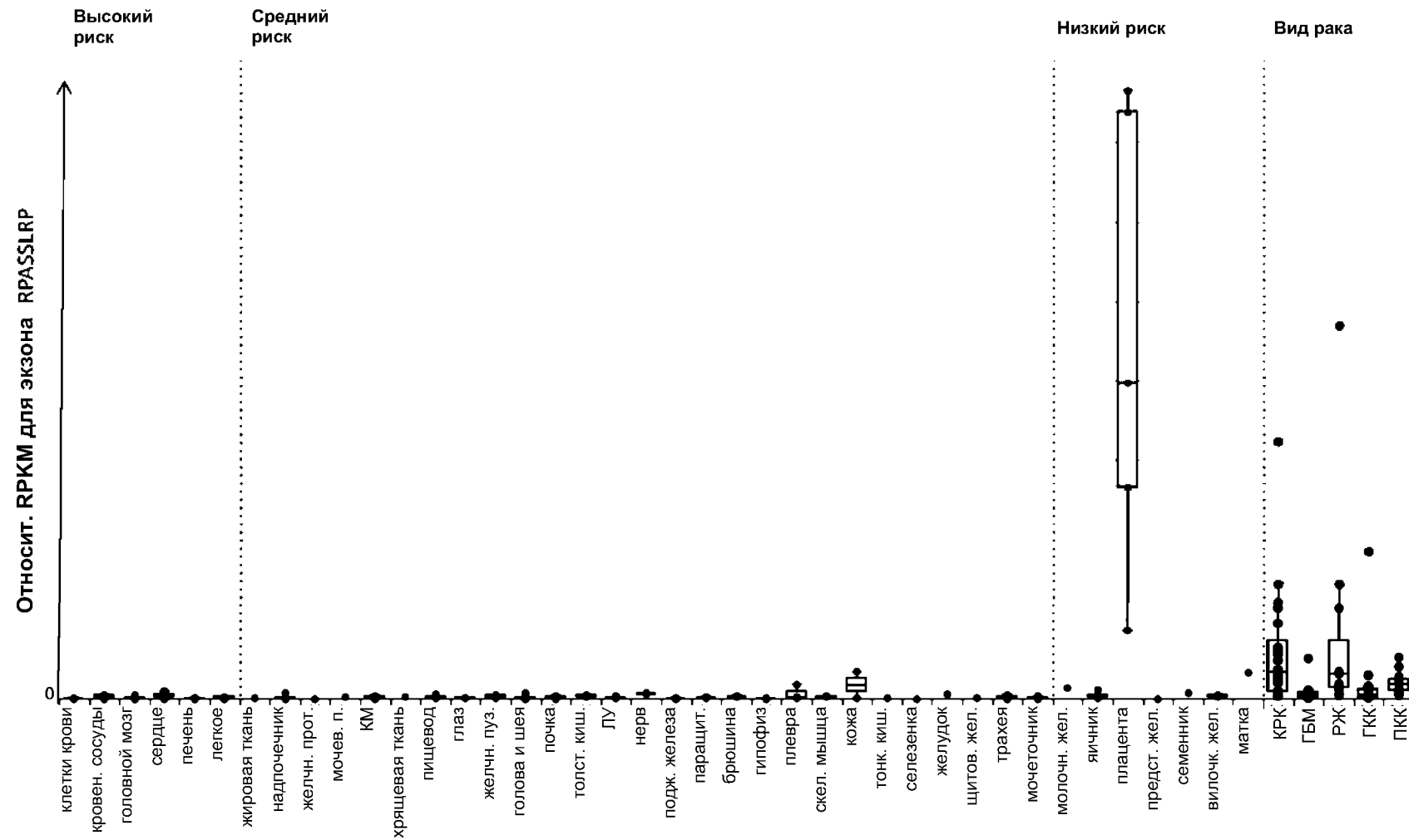


Фигура 1L

Ген: MMP11

Пептид: RPASSLRP

SEQ ID No: 163

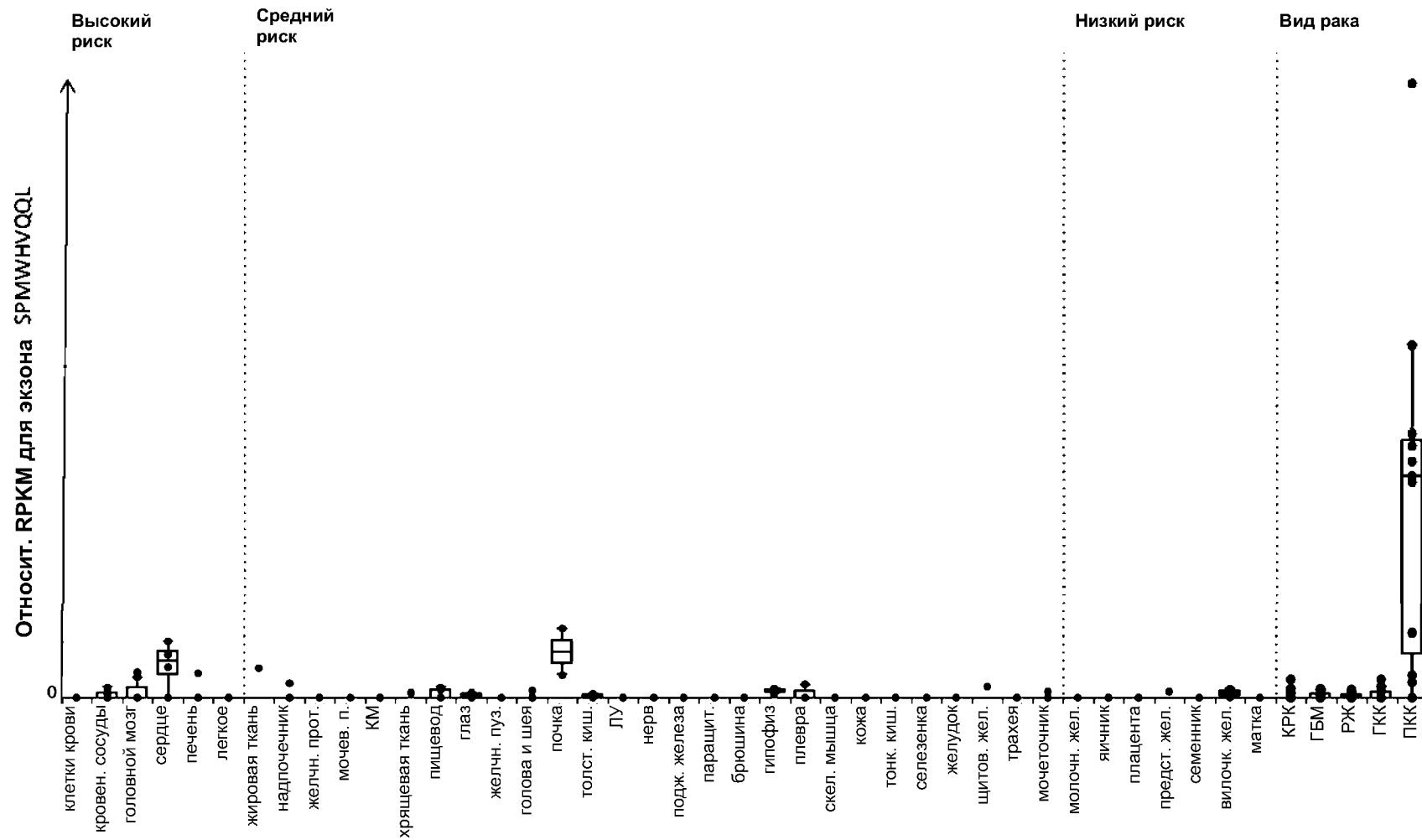


Фигура 1М

Ген: QRFPR

Пептид: SPMWHVQQQL

SEQ ID No: 170

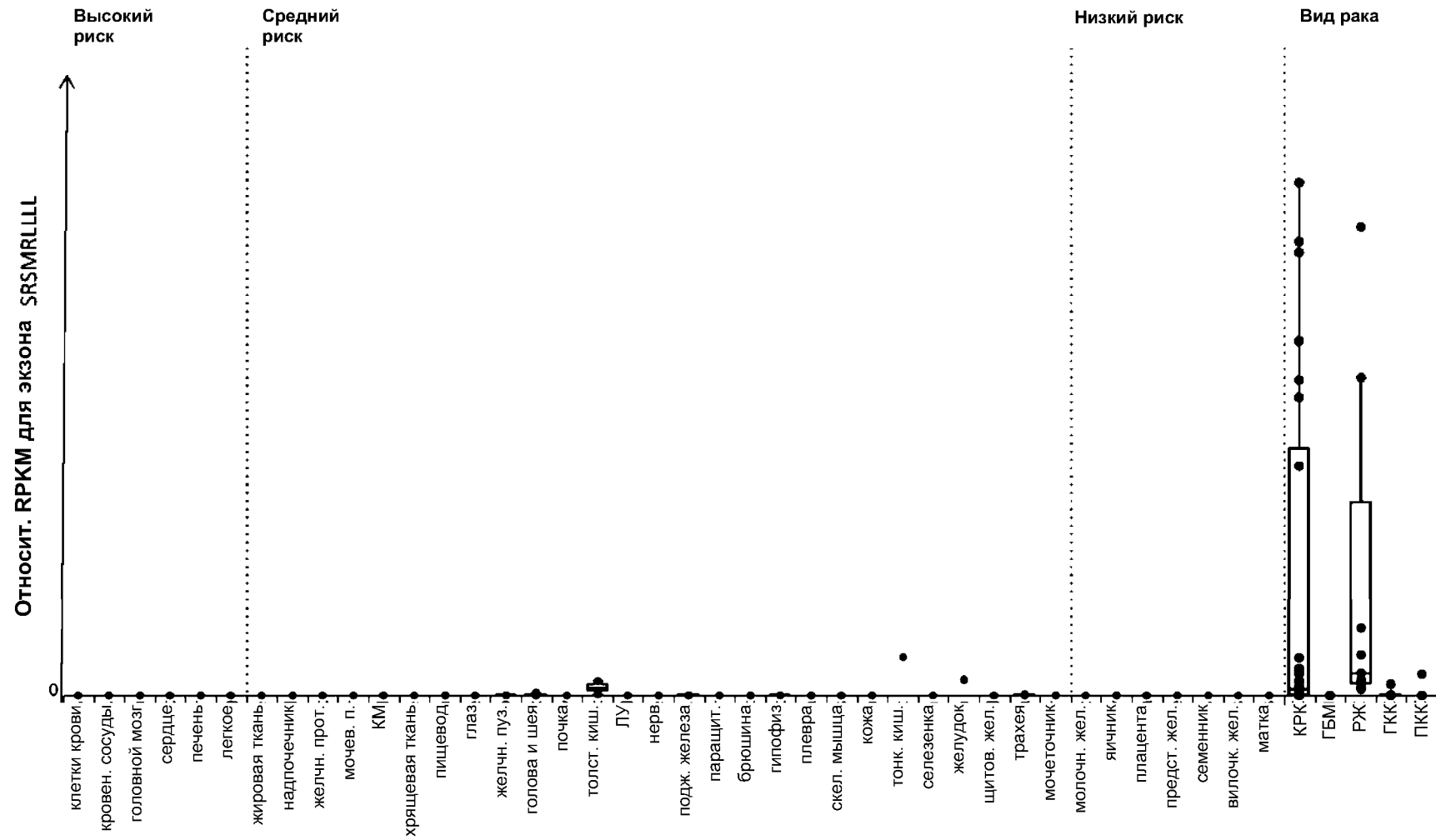


Фигура 1N

Ген: REG4

Пептид: SRSMRLLLL

SEQ ID No: 190

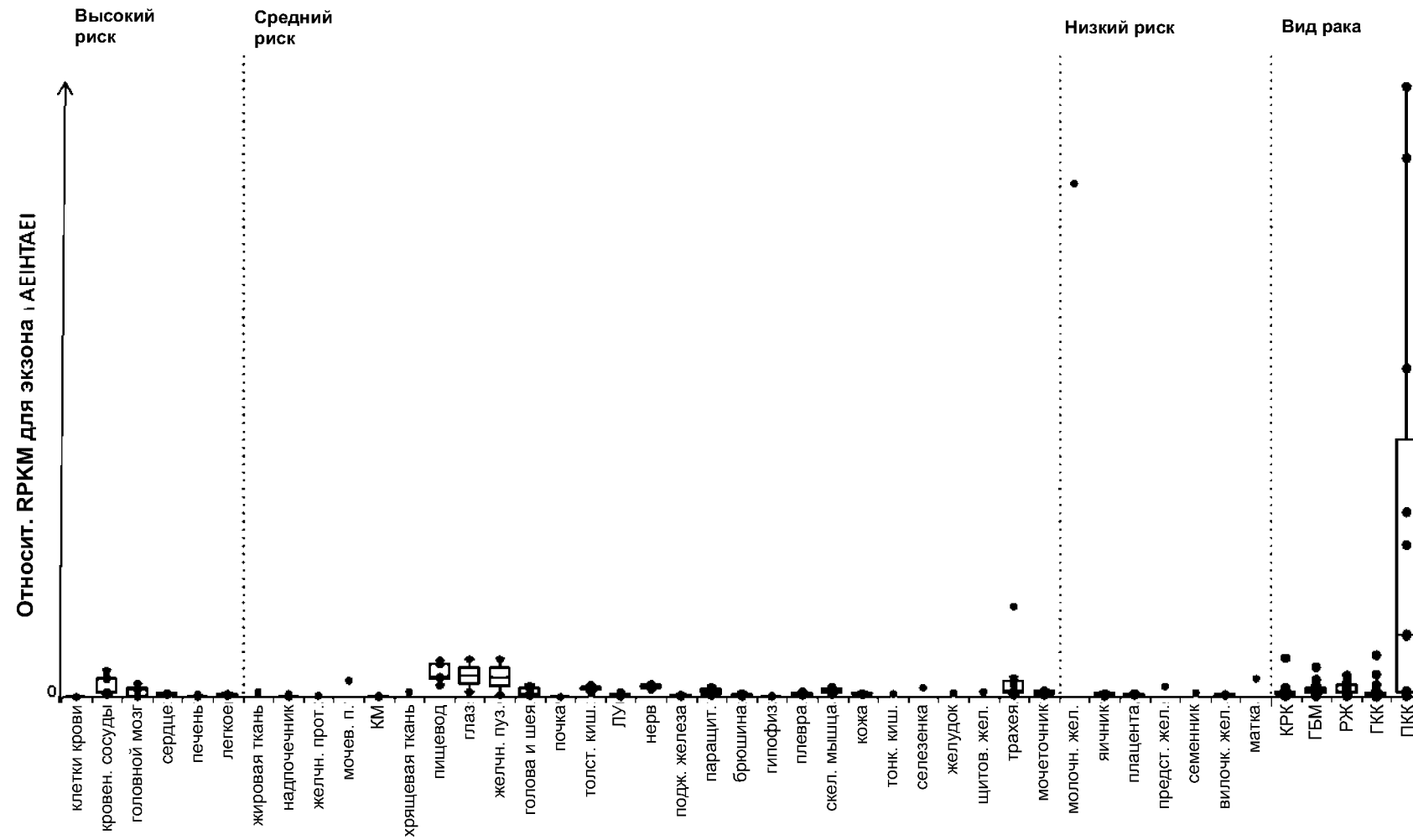


Фигура 10

Ген: PTHLN

Пептид: AEINTAEI

SEQ ID No: 231

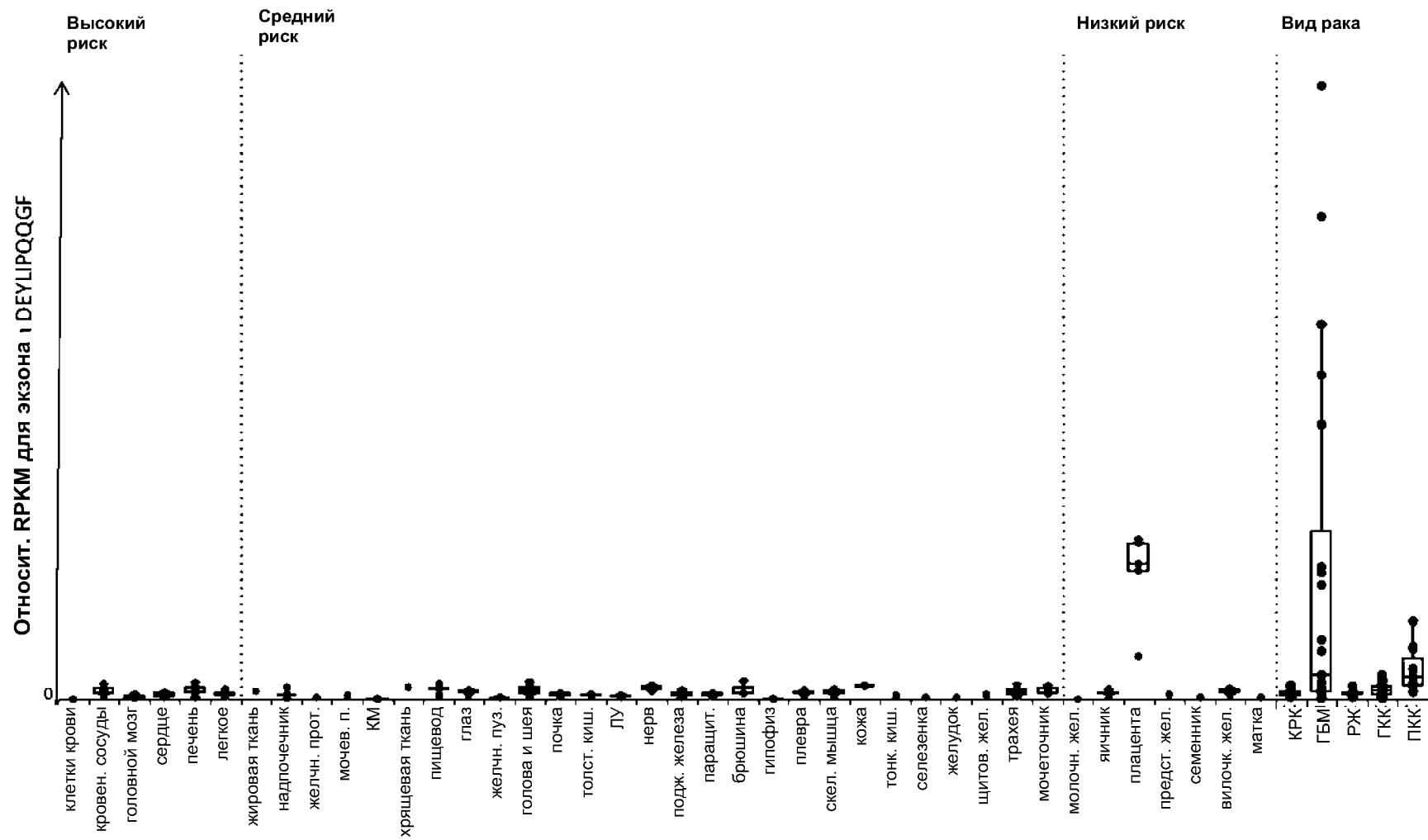


Фигура 1Р

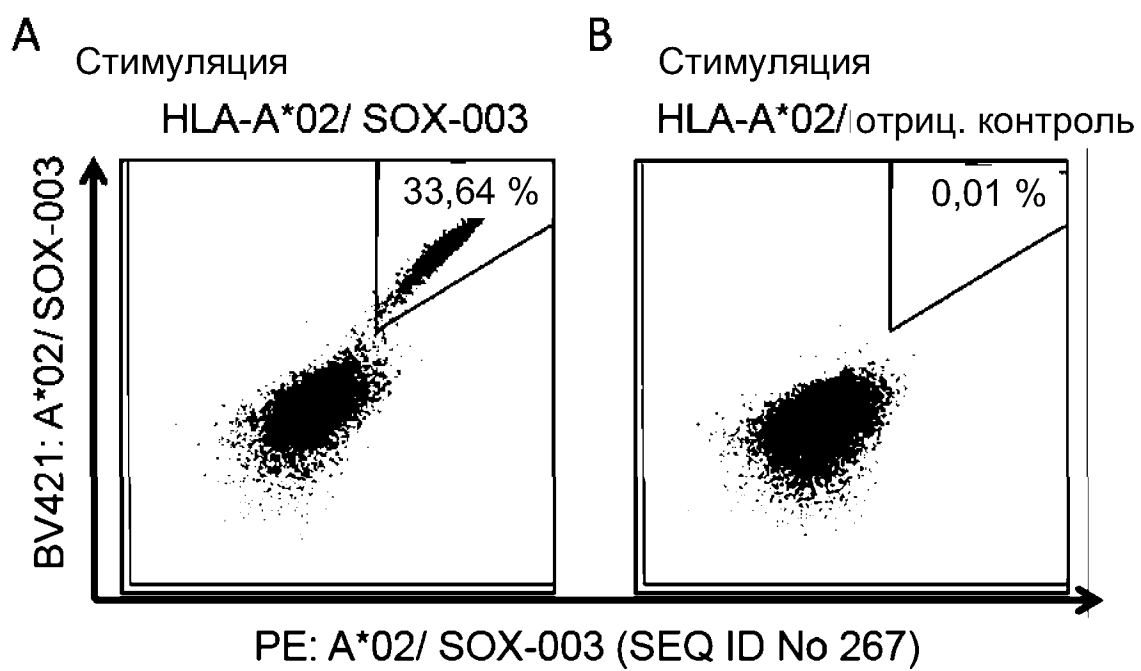
Ген: EGFR

Пептид: DEYLIPQQGF

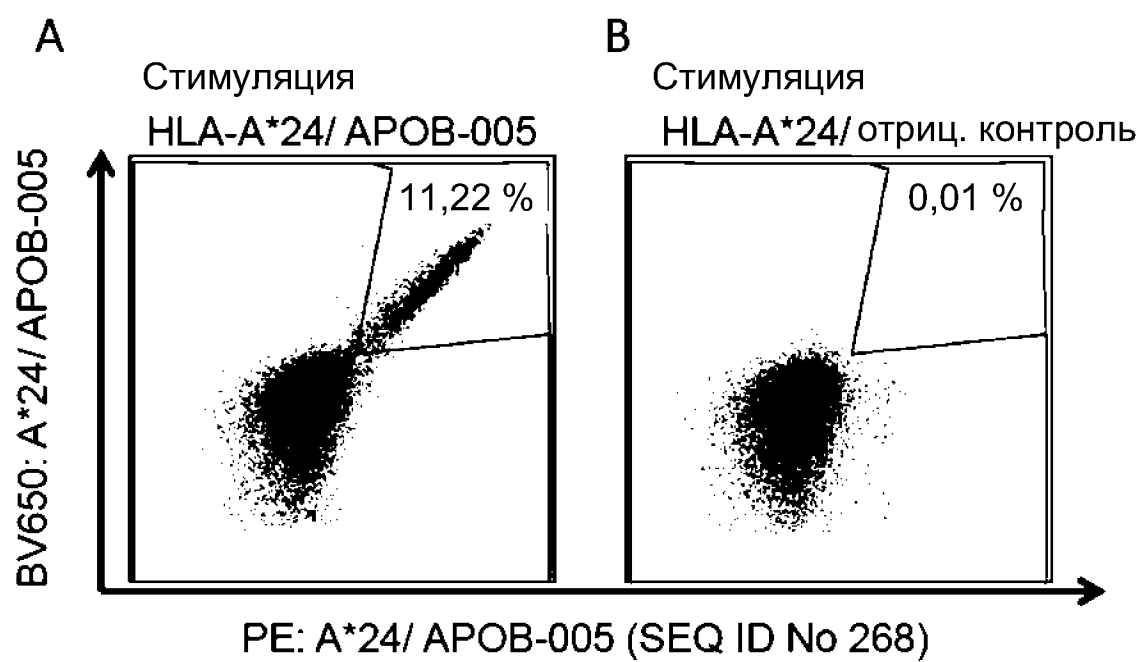
SEQ ID No: 264



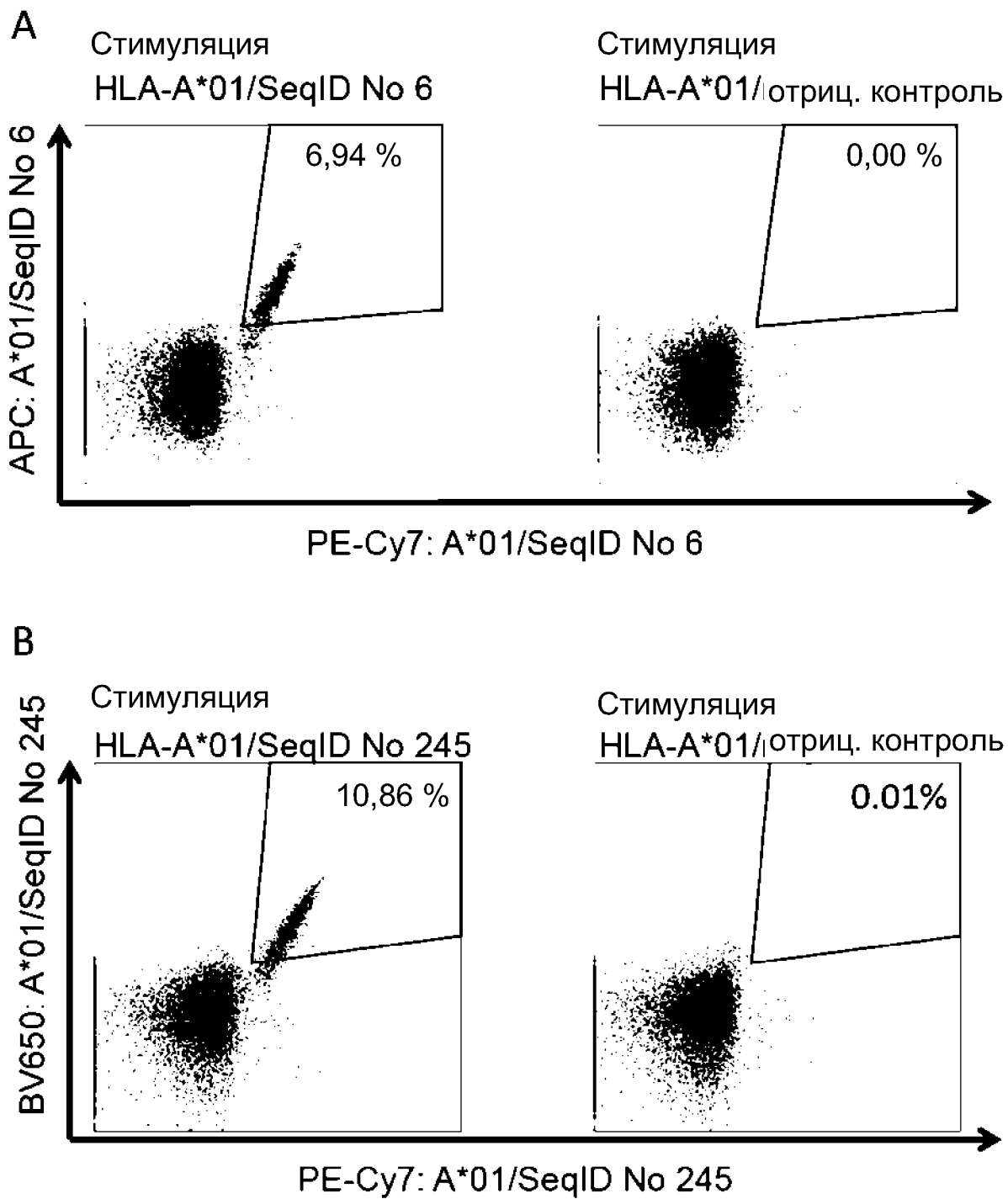
Фигура 2



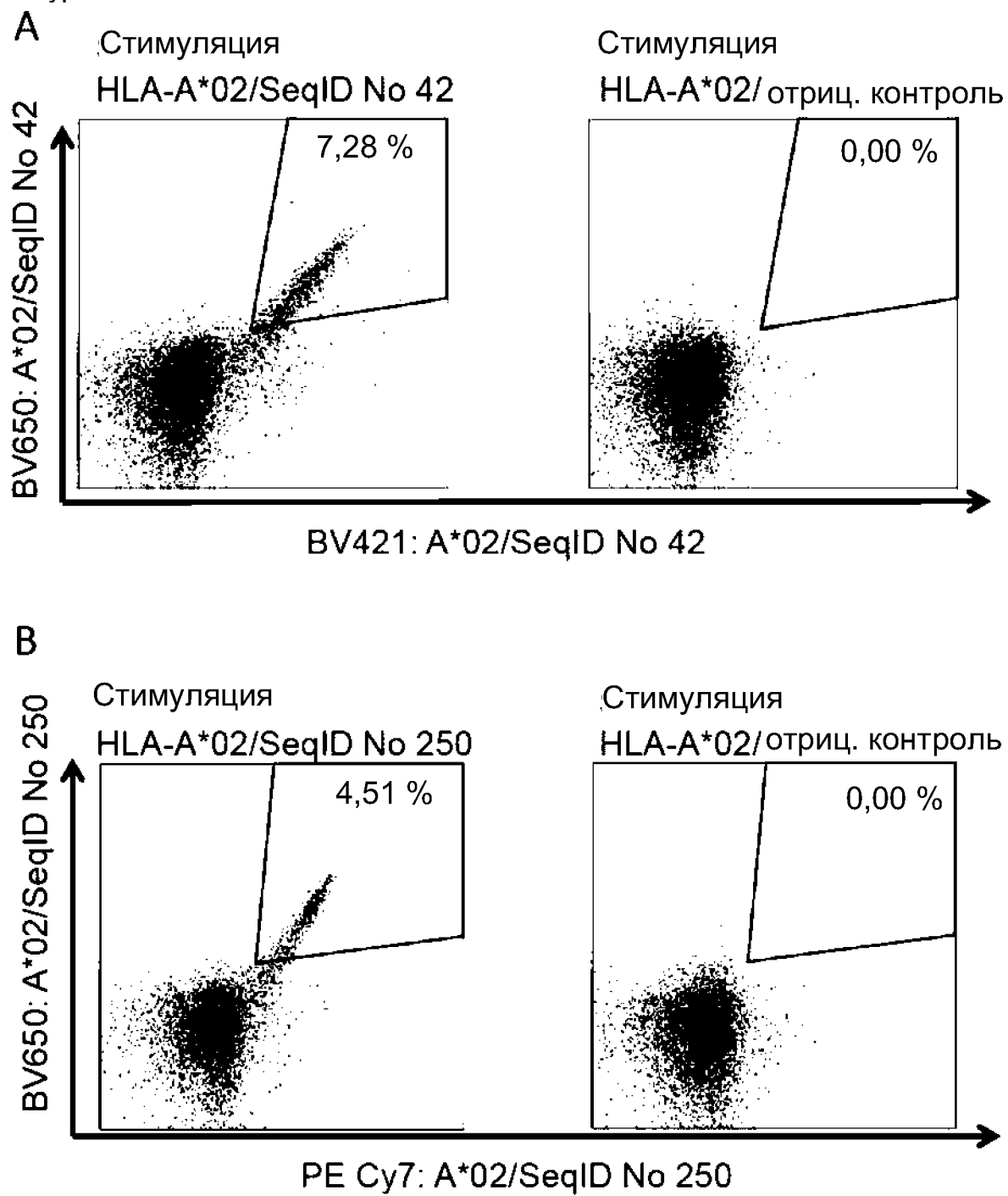
Фигура 3



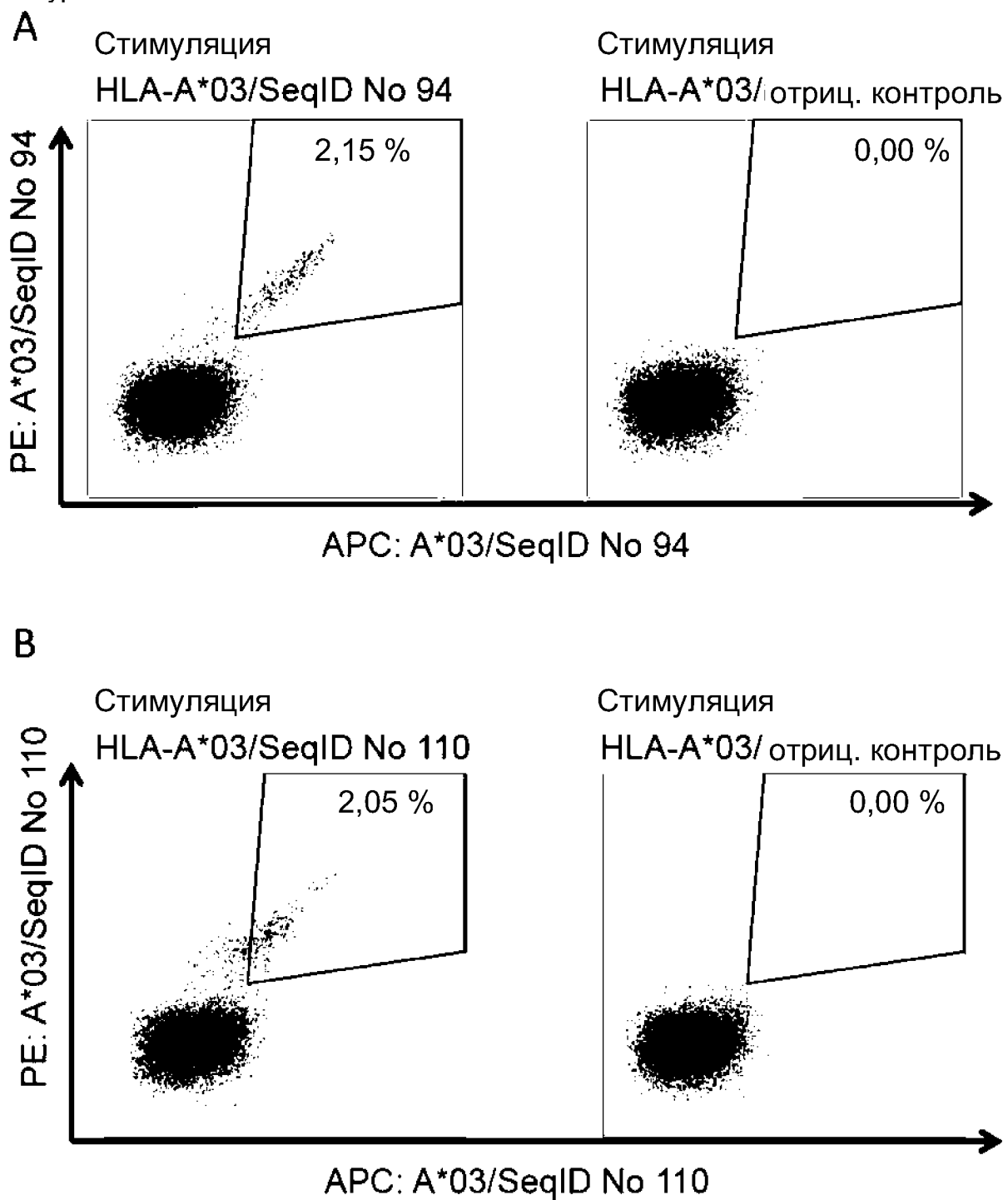
Фигура 4



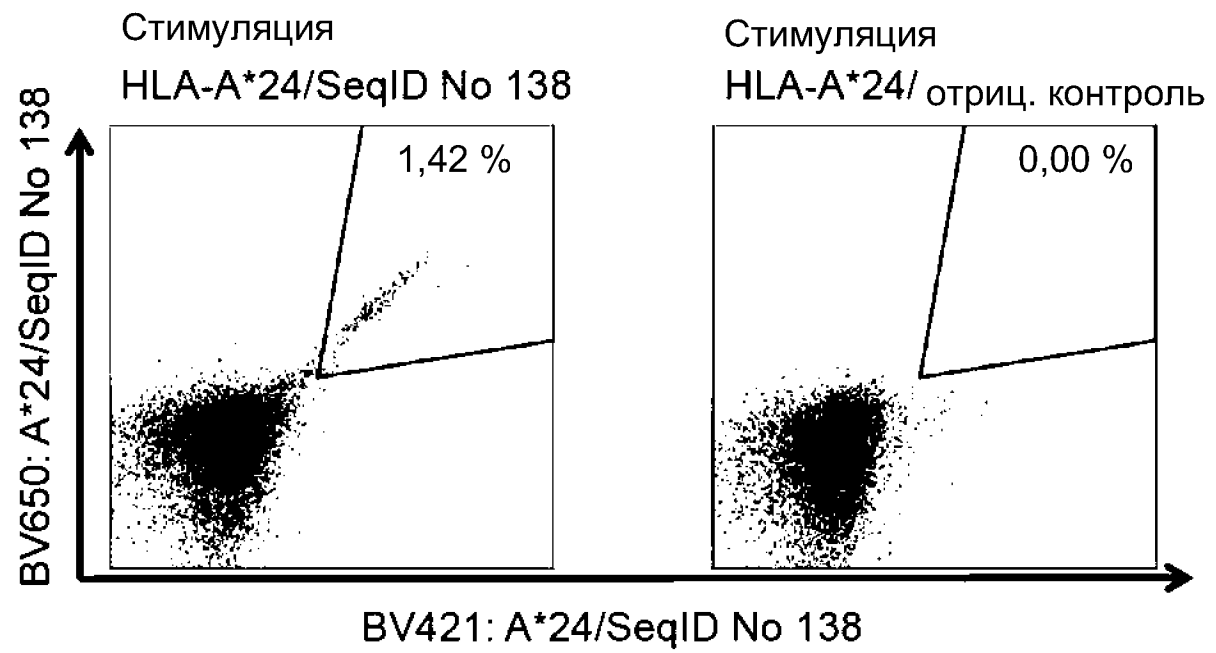
Фигура 5



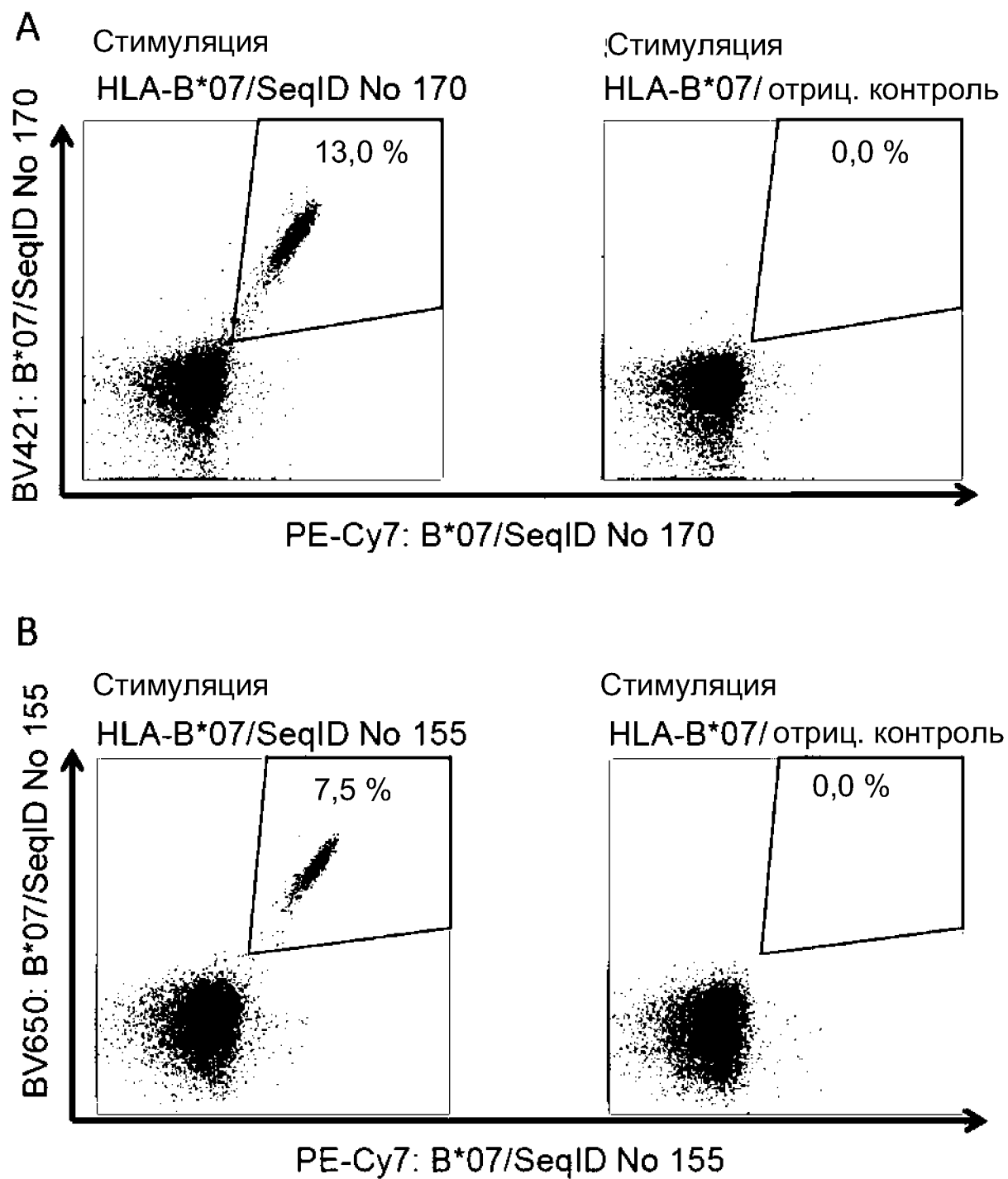
Фигура 6



Фигура 7



Фигура 8



Фигура 9

