

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090751** (13) **A2**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.07.31

(51) Int. Cl. *C07K 14/47* (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)

(22) Дата подачи заявки
2015.05.08

(54) НОВЫЙ МЕТОД ИММУНОТЕРАПИИ НЕСКОЛЬКИХ ВИДОВ ОПУХОЛЕВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КРОВИ, ТАКИХ КАК ОСТРЫЙ МИЕЛОИДНЫЙ ЛЕЙКОЗ (ОМЛ)

(31) 61/990,980; 1408255.6

(32) 2014.05.09

(33) US; GB

(62) 201692103; 2015.05.08

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

(72) Изобретатель:

**Стикель Джулиан, Ковалевски
Дэниел, Берлин Клаудиа, Раммензее
Ханс-Георг, Стеванович Стефан (DE)**

(74) Представитель:

**Костюшенкова М.Ю., Лебедев В.В.,
Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Парамонова К.В.,
Джермакян Р.В., Глухарёва А.О.,
Угрюмов В.М., Христофоров А.А. (RU)**

(57) Настоящее изобретение относится к пептидам, нуклеиновым кислотам и клеткам для применения в иммунотерапевтических методах. В частности, настоящее изобретение относится к иммунотерапии рака. Настоящее изобретение относится далее к опухолиассоциированным цитотоксическим пептидным эпитопам Т-клеток (ЦТЛ), в отдельности или в комбинации с другими опухолиассоциированными пептидами, которые служат в качестве активных фармацевтических ингредиентов вакцинных композиций, стимулирующих противоопухолевые иммунные ответы. Настоящее изобретение относится к нескольким новым пептидным последовательностям и их вариантам, образованным из молекул HLA класса I и HLA класса II человеческих опухолевых клеток, которые могут быть использованы в вакцинных композициях для вызывания противоопухолевых иммунных ответов.

A2

202090751

202090751

A2

НОВЫЙ МЕТОД ИММУНОТЕРАПИИ НЕСКОЛЬКИХ ВИДОВ ОПУХОЛЕВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КРОВИ, ТАКИХ КАК ОСТРЫЙ МИЕЛОИДНЫЙ ЛЕЙКОЗ (ОМЛ)

Область техники

Настоящее изобретение относится к пептидам, нуклеиновым кислотам и клеткам для применения в иммунотерапевтических методах. В частности, настоящее изобретение относится к иммунотерапии рака. Настоящее изобретение относится далее к опухолеассоциированным цитотоксическим пептидным эпитопам Т-клеток (ЦТЛ), в отдельности или в комбинации с другими опухолеассоциированными пептидами, которые служат в качестве активных фармацевтических ингредиентов вакцинных композиций, стимулирующих противоопухолевые иммунные ответы. Настоящее изобретение относится к нескольким новым пептидным последовательностям и их вариантам, образованным из молекул HLA класса I и HLA класса II человеческих опухолевых клеток, которые могут быть использованы в вакцинных композициях для вызывания противоопухолевых иммунных ответов.

Уровень техники

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), известный также как острый миелогенный лейкоз или острый нелимфобластный лейкоз, является раком клеток крови миелоидной линии, характеризующимся быстрым ростом аномальных лейкоцитов, которые скапливаются в костном мозге и препятствуют выработке нормальных клеток крови. ОМЛ является распространенным видом острого лейкоза, поражающим взрослых, частота заболевания возрастает с возрастом. Хотя ОМЛ – довольно редкое заболевание, на долю которого приходится приблизительно 1,2% смертности от рака в США, частота заболеваемости, как ожидается, может возрасти в связи со старением населения.

Симптомы ОМЛ вызваны заменой нормального костного мозга на лейкемические клетки, что вызывает снижение уровня эритроцитов, тромбоцитов и нормальных лейкоцитов. Эти симптомы сопровождаются усталостью, одышкой, частым возникновением гематом и кровотечений и повышенным риском инфекций. Были идентифицированы несколько факторов риска и хромосомных аномалий, однако их

конкретная причина неясна. ОМЛ, будучи острой формой лейкоза, прогрессирует быстро и обычно приводит к летальному исходу в течение нескольких недель или месяцев, если не подвергается лечению.

ОМЛ имеет несколько подтипов; способ лечения и прогноз варьируется в зависимости от подтипа. Пятилетняя выживаемость варьируется в пределах 15–70%, а частота рецидивов составляет 33–78% в зависимости от подтипа. В качестве первичного лечения ОМЛ применяется химиотерапия, направленная на достижение ремиссии; впоследствии пациенты могут получать дополнительную химиотерапию или пройти трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток.

В заявке США 2005/0261190 A1 раскрыты полипептидные фрагменты полипептида Fas-ассоциированного фактора 1, которые связываются с Hsc70/Hsp70, убиквитинированным белком или валозин-содержащим белком. Некоторые из фрагментов включают последовательность SEQ ID NO: 5, раскрытую в настоящем описании.

В равной степени, в патенте KR100692416 раскрыт фрагмент FAF-1 (Fas-ассоциированный фактор 1) в качестве оказывающего ингибирующее воздействие на ангиогенез и клеточную пролиферацию. Поэтому он предложен в качестве противоракового средства, например, средства, ингибирующего развитие метастазов опухоли. Фракция, имеющая ингибирующее влияние, на метастазы опухоли, состоит из 290-345 аминокислот белка FAF1.

Hassan и соавт. (The human leukocyte antigen-presented ligandome of B lymphocytes. Mol Cell Proteomics. 2013 Jul;12(7):1829-43) раскрывают способы идентификации и относительного количественного определения 14 500 пептидных лигандов, входящих в состав лигандома HLA В-клеток, в качестве отправного пункта для решения множества специфических иммунологических вопросов.

Kowalewski и соавт. (Mapping The HLA Ligandome Of Chronic Lymphocytic Leukemia – Towards Peptide Based Immunotherapy Blood 2013; 122(21):4123) описывают способ анализа пептидомов HLA I класса 25 пациентов, больных хроническим лимфоцитарным лейкозом (ХЛЛ) и 35 здоровых доноров.

Несмотря на описанное выше до сих пор существует потребность в новом, эффективном и безопасном способе лечения таких видов рака, как рак крови, в частности острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) и других раковых заболеваний крови различных фенотипов, которые улучшали бы самочувствие пациентов без чрезмерного применения химиотерапевтических средств или других веществ, которые могут вызывать тяжелые побочные эффекты.

В настоящем изобретении использованы пептиды, которые стимулируют иммунную систему пациента и выполняют функцию противоопухолевых препаратов неинвазивного способа воздействия.

Сущность изобретения

В первом аспекте настоящее изобретение относится к пептиду, включающему аминокислотную последовательность, выбранную из группы с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 325, SEQ ID NO: 326 по SEQ ID NO: 447 или с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 605 или его варианту, который по меньшей мере на 80%, предпочтительно, по меньшей мере на 90% гомологичен (предпочтительно, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентичен) последовательности с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 325 или с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 605, где указанный вариант индуцирует Т-клеточную перекрестную реакцию с указанным пептидом, или его фармацевтически приемлемой соли, где указанный пептид не является базовым полипептидом полной длины.

Настоящее изобретение далее относится к пептиду по настоящему изобретению, включающему последовательность, которая выбирается из группы с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 325, SEQ ID NO: 326 по SEQ ID NO: 447 или с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 605, или его варианту, который по меньшей мере на 80%, предпочтительно, по меньшей мере на 90% гомологичен (предпочтительно, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентичен) последовательности с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 325 или с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 605, где указанный пептид или его вариант имеет общую длину в случае последовательности с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 325, составляющую 8 – 100, предпочтительно 8 – 30 и, наиболее предпочтительно, 8 – 14

аминокислот, и в случае SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 605, составляющую 12 – 100, предпочтительно 12 – 30, и, наиболее предпочтительно, 12 – 18 аминокислот.

В последующих таблицах представлены пептиды по настоящему изобретению, соответствующие им SEQ ID NO и потенциальный(ые) исходный(ые) белок(и) для данных пептидов. Все пептиды в Таблице 1 связываются с аллелями HLA-A, HLA-B или HLA-C, пептиды в Таблице 2 были идентифицированы в качестве образованных из связанных с ОМЛ антигенов, а пептиды в Таблице 3 связываются с аллелями HLA-DR (МНС II класса). Пептиды II класса из Таблицы 3 далее полезны для постановки диагноза и/или лечения ОМЛ, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ) и других гематологических злокачественных заболеваний, которые включают избыточную экспрессию или избыточную презентацию соответствующего базового полипептида.

Таким образом, настоящее изобретение относится, в частности, к пептиду по настоящему изобретению, включающему последовательность по SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO 605 или его варианту, который по меньшей мере на 80%, предпочтительно, по меньшей мере на 90% гомологичен (предпочтительно, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентичен) последовательности с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO 605, где указанный пептид или его вариант обладает общей длиной, составляющей 12 – 100, предпочтительно 12 – 30 и, наиболее предпочтительно, 12 – 18 аминокислот. Настоящее изобретение относится в частности к пептиду по настоящему изобретению, состоящему из последовательности по SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO 605.

Таблица 1: Пептиды по настоящему изобретению, базовые пептиды выделены жирным шрифтом

SEQ ID	Белок/пептиды	Число положительных ОМЛ [частота предст.]	HLA
1	FAF1 Fas (TNFRSF6)-ассоциированный фактор 1	8 [53,3%]	
2	AEQFRLEQI	1	B*44
3	FTAEFSSRY	2	A*03
4	HHDESVLTNVF	3	B*38:01
5	REQDEAYRL	1	B*44:25
6	RPVMPSRQI	1	B*07
	VQREYNLNF	1	B*15
	PLXND1 плексин D1	7 [46,7%]	

7	GQLPITIQV	1	B*13:02
8	RAYADEVAV	1	B*51:01
9	REDKPPLAV	1	B*49:01
10	RVKDLDEKY	2	B*15
11	SEQEMNAHL	1	B*44:25
12	YVLPLVHSL	1	A*02
13	LPLRFWVNI	1	B*51:01
	GMNN геминин, ингибитор репликации ДНК	6 [40,0%]	
14	EVAEHVQYM	3	A*26:01
15	YMAELIERL	3	A*02
	CPQ карбоксипептидаза Q	6 [40,0%]	
16	ALASLIRSV	5	A*02
17	TVAEITGSKY	1	A*26:01
	ATP5L АТФ-синтаза, митохондриальный комплекс Fo, транспортирующий H⁺, субъединица G	5 [33,3%]	
18	EIGKRGIGY	4	A*26, A*03:01
19	NLVEKTPAL	1	A*02
	ITGA5 интегрин, альфа 5	5 [33,3%]	
20	IEDKAQILL	3	B*49:01/ B*40
21	SIYDDSYLGY	1	A*26:01
22	TTNHPINPK		A*11
	SKP1 белок 1, ассоциированный с киназой S-фазы	5 [33,3%]	
23	NAAILKKV	2	B*51:01
24	NYLDIKGLL	1	A*24
25	YLDIKGLLDV	2	A*02
	CHD1L подобный хромодомену геликазы ДНК-связывающего белка 1	5 [33,3%]	
26	EEVGDFIQRY	1	B*44:03
27	EVGDFIQRY	4	A*26:01, A*03
28	MKDLSLGGVL	1	н. п.
	TGFBRAP1 трансформирующий фактор роста, белок 1, ассоциированный с бета-рецептором	5 [33,3%]	
29	DEFITVHSM	1	B*18:01
30	EFITVHSML	2	A*23:01
31	GQLDVRELI	1	B*13:02
32	TQYIHHNY	1	B*15
	NGLY1 N-гликаназа 1	5 [33,3%]	
33	EVVDVTWRY	4	A*26, A*03:01
34	KEALLRDTI	1	B*49:01
	APLP2 белок 2, подобный предшественнику бета-амилоида (A4)	5 [33,3%]	
35	HGYENPTYK	4	A*03
36	SLLYKVPPYV	1	A*02
	KIF2C член семейства кинезинов 2C	5 [33,3%]	
37	AEIPLRMV	1	B*49:01

38	EVVYRFTAR	1	A*66
39	FPGLAIKI	2	B*51:01
40	IYNGKLFDL	1	A*24
41	IYNGKLFDLL	1	A*24
42	KEIDVISI	1	B*49:01
43	LEEQASRQI	1	B*49:01
44	TRMSTVSEL	1	B*39:01
	ELP3 элонгационный комплекс	5 [33,3%]	
	ацетилтрансферазы, субъединица 3		
45	SEETFRFEL	1	B*40
46	KLYPTLVIR	4	A*03
	DGKZ диацилглицеролкиназа, дзета	5 [33,3%]	
47	ALRNQATMVQK	2	A*03:01
		3	
48	LLDHAPPEI	3	A*02
	MTCH2 митохондриальный переносчик 2	5 [33,3%]	
49	GVLGTVVHGK	4	A*03:01
50	VQFIGRESKY	1	B*15
	SLC31A2 семейство транспортера растворенных	4 [26,7%]	
	веществ 31 (переносчик меди), член 2		
51	GQSLIHVI	1	B*52:15
52	VHSPAGMAL	1	B*38:01
53	VLYEGIKVGK	4	A*03
	ERLIN1 белок 1, ассоциированный с липидным	4 [26,7%]	
	рафтом ЭР		
54	AVIEAEKIAQV	2	A*02
55	DRIEVVNML	1	B*39:01
56	IEAEKIAQV	1	B*49:01
	SERPINB2 ингибитор серпин-пептидазы, клада В	4 [26,7%]	
	(овальбумин), член 2		
57	IEDLKAQIL	1	B*49:01
58	YLLESVNKL	3	A*02
	ABHD2 белок 2, содержащий домен альфа/бета-	4 [26,7%]	
	гидролазы		
59	HRIYVPLML	1	B*39:01
60	KEYIPPLIW	1	B*4403
61	MDKLVVEY	2	B*15
	GAA глюкозидаза, альфа; кислая	4 [26,7%]	
62	ALLGHILLH	1	A*03:01
63	ALLPHLYTL	2	A*02
64	HVAGETVAR	1	A*66
65	KVWPGSTAF	1	A*32
	OPRL1 подобный опиатному рецептору 1	4 [26,7%]	
66	ETAVAILRF	4	A*26, A*03:01
	WDR45B домен WD-повтора 45B	4 [26,7%]	
67	RVYNTDPLKEK	4	A*03
	TUFM фактор элонгации трансляции Tu,	4 [26,7%]	
	митохондриальный		
68	IGVEHVVVY	4	C*12:03
69	RQIGVEHVV	1	B*15

	MFAP1 белок 1, ассоциированный с микрофибриллами	4 [26,7%]	
70	DVFERPSAKK	1	A*66
71	EEFQFIKKA	2	B*40:02, B*50
72	THLVDQDTTSF	1	B*38
	ZNF543 белок с доменом zinc finger 543	4 [26,7%]	
73	ESADLIQHY	4	A*26, A*03:01
	STK4 серин-/треонинкиназа 4	4 [26,7%]	
74	EIIKEISIM	3	A*26
75	SVSDIIRLR	1	A*66
	ZKSCAN8 белок 8 с доменом zinc finger, с доменами KRAB и SCAN	4 [26,7%]	
76	AVSLIREEW	2	A*32
77	GEKSESISV	1	B*49:01
78	FLTILPEEL	1	A*02:01
	FNDC3B белок 3B, содержащий домен фибронектина III типа	4 [26,7%]	
79	ILWETVPSM	1	A*02:01
80	LPVRTLSI	1	B*51:01
81	RESEYKQVY	1	B*44:03
82	SESLPVRTL	1	B*40
	TMEM164 трансмембранный белок 164	4 [26,7%]	
83	RLLESVVVL	1	A*02:01
84	RPEEGKESL	1	B*07
85	THGKLVILF	2	B*38
	THOC7 гомолог комплекса 7 THO	4 [26,7%]	
86	KELEHLSHI	1	B*49:01
87	REMEYNEKI	2	B*49:01 B*44:25
88	VLLSTIHLE	2	A*02
	KLF2 Круппель-подобный фактор 2	4 [26,7%]	
89	KTYTKSSHLLK	4	A*03
	TMEM126B трансмембранный белок 126B	4 [26,7%]	
90	EIEKNFDY	3	A*26
91	GTEEAPKVFK	1	A*11
92	KLMAIPLVF	1	B*15
	UFD1L подобный белку 1, подобный убиквитин-опосредованной деградации белков	4 [26,7%]	
93	DIKRGIPN	1	Fragment of Seq 94
94	DIKRGIPNY	1	A*26
95	FLDITNPKA	2	A*02
	MUL1 митохондриальная E3 убиквитинлигаза 1	4 [26,7%]	
96	ALYSVYRQK	2	A*03
97	KVLALVFGF	1	B*15
98	SFTDVIGHY	1	A*29
	VCPIP1 белок 1, взаимодействующий с комплексом валозин-содержащего белка (p97)/p47	4 [26,7%]	

99	ASAAASGGLLK	3	A*03:01
100	ALLGVTGAPK	1	A*03
	FAM46A семейство со схожестью последовательности 46, член А	4 [26,7%]	
101	DEIKTLQRY	1	B*18:01
102	EAYVQKMV	1	B*51:01
103	VLHQDSGLGY	1	B*15
104	YLQNHFVGL	1	A*02
	KIF20B член семейства кинезинов 20B	4 [26,7%]	
105	AEIEDIRVL	1	B*44:25
106	GQSRLIFTY	1	B*15
	READFKETL	2	B*49:01, B*40
107	CSF3R рецептор гранулоцитарного колониестимулирующего фактора 3	4 [26,7%]	
108	DTMGPSQHVV	1	A*26
109	ESRGPALTR	1	A*66
110	FQLPGLGTPPIT	1	C*12:03
111	RIQGYVVSWS	1	A*32
	NOC4L гомолог белка 4, ассоциированного с ядрышковым комплексом	4 [26,7%]	
112	LLDPSVFHV	3	A*02
113	RFFHLADLF	1	A*23:01
	EMILIN2 белок 2, интерфейс эластиновых микрофибрилл	4 [26,7%]	
114	DSISGNLQR	1	A*66
115	ETEQTIQKL	1	н. п.
116	FLYPFLSHL	1	A*02
117	TLDQKIERV	3	A*02:01
	SHANK3 SH3 и домены с несколькими анкириновыми повторами	4 [26,7%]	
118	DADSRATV	1	B*51:01
119	DHEGFGFVL	1	B*38:01
120	GEAVKVLSI	1	B*49:01
121	NATDLLKVL	2	C*12:03
	UCK2 уридин-цитидин киназа 2	4 [26,7%]	
122	KEITEGKTV	1	B*40:02
123	YRQKQVVIL	2	C*07
124	VAINLIVQH	1	A*03:01
	PHPT1 фосфогистидин-фосфатаза 1	4 [26,7%]	
125	SQDKKIHVV	1	B*15
	YHADIYDKV	3	B*38, B*39:01
126	KIF15 член семейства кинезинов 15	4 [26,7%]	
127	DAIKVFVRI	1	B*51:01
128	LEKAFSEI	1	B*49:01
129	MEKSDKNQ	1	н. п.
130	GQTGSGKTF	1	B*15
	SLC12A6 семейство транспортера растворенных веществ 12 (транспортер калия/хлорида), член 6	4 [26,7%]	
131	DTSPDLSSR	1	A*66

132	KLNEVIVNK	3	A*03
	DOLK долихолкиназа	4 [26,7%]	
133	FAQIISVALI	1	A*02
134	IIFDRPLLY	3	A*03:01, A*29
	EEF2K киназа эукариотического фактора элонгации 2	3 [20,0%]	
135	DAVNQNTKLL	1	A*02
136	HHILADVSL	1	B*38:01
137	YPSEKRGEL	1	B*07
	PIK3R2 фосфоинозитид-3-киназа, регуляторная субъединица 2 (бета)	3 [20,0%]	
138	SVVDLINHY	3	A*26
	TMEM194A трансмембранный белок 194A	3 [20,0%]	
139	EIEKDTKY	2	A*26
140	ENEEKLKEL	1	н. п.
	CCS шаперон меди для доставки меди к супероксид-дисмутазе	3 [20,0%]	
141	ILGGPGTVQGV	3	A*02
	ZNF264 белок с доменом zinc finger 264	3 [20,0%]	
142	ESAALINHY	2	A*26
143	YQRETPQV	1	B*52:15
	LYRM1 белок 1, содержащий мотив LYR	3 [20,0%]	
144	ARIEIGLHY	1	B*27:05
145	IPYPRPIHL	2	B*07, B*51:01
	NBN нибрин	3 [20,0%]	
146	DVSGKTALNQ	1	н. п.
147	TEFRSLVI	1	B*49:01
148	TLKSGDGITF	1	B*15
	TIPRL TIP41, подобный регулятору сигнального пути TOR	3 [20,0%]	
149	HEADKTYML	1	B*40
150	KFFEEVLLF	1	A*23:01
151	RVMPSSFFL	1	A*02:01
	RPS6KA4 рибосомный белок S6-киназа, 90 кДа, полипептид 4	3 [20,0%]	
152	YELDLREPAL	2	B*40
153	GAYGKVFLV	1	A*02:01
	RCBTB2 регулятор конденсации хромосом (RCC1) и белок 2, содержащий домен BTB (POZ)	3 [20,0%]	
154	DHDLLKNF	2	B*38
155	EELQLIRQA	1	B*44
	PAK4 активируемая белком p21 (Cdc42/Rac) киназа 4	3 [20,0%]	
156	AAELLKHPF	2	A*32
157	GRVKLSDFGF	1	B*27:01
	ERCC1 кросс-комплементирующий ген эксцизионной репарации дефектов у грызунов, группа комплементации 1 (включает	3 [20,0%]	

	перекрывающую антисмысловую последовательность)		
158	KSNSIIVSPR	3	A*03
	DMD дистрофин	3 [20,0%]	
159	ETLERLQEL	1	A*02:01
160	KDDELSRQ	1	н. п.
161	LQQTNSEKI	1	B*13:02
	UNG урацил-ДНК-гликозилаза	3 [20,0%]	
162	GEFGKPYFI	1	B*49:01
163	KDVKVVIL	1	B*40:02
164	RPVPPPSL	1	B*07
	CPA3 карбоксипептидаза A3	3 [20,0%]	
165	KEDIPGRHSY	1	B*44:02
166	KETKAVTNF	1	B*44:03
167	YEILIHDL	3	B*44:02, B*44:03, B*18:01
	AZU1 азуроцидин 1	3 [20,0%]	
168	FPRFVNVTV	1	B*51:01
169	QVAGWGSQR	1	A*66
170	WIDGVLNNPGPG	1	н. п.
	ATP2B4 АТФаза, транспортирующая Ca++, плазматической мембраны 4	3 [20,0%]	
171	SFMTHPEF	1	A*29
172	HYTIVFNTF	1	A*23:01
173	GTNDGPALKK	1	A*11
174	IEDPVRPEV	1	B*49:01
	MARK3 MAP/киназа микротрубочек 3, регулирующая аффинность	3 [20,0%]	
175	NTASGGMTR	1	A*66
176	EVIETEKTLY	1	A*26:01
177	MKILNHPNI	1	B*15
	HLA-DMA главный комплекс гистосовместимости, II класса, DM альфа	3 [20,0%]	
178	HEIDRYTAI	1	B*49:01
179	VFTLKPLEF	1	A*24
180	YWVPRNAL	1	C*05
	NDUFS1 НАД-Н дегидрогеназа (убихинон) Fe-S белок 1, 75 кДа	3 [20,0%]	
181	EVSPNLVRY	2	A*26
182	LSEIAGMTLP	1	н. п.
	S100A11 S100 кальций-связывающий белок A11	3 [20,0%]	
183	FLSFMNTEL	1	A*02:01
184	KAVPSQKRT	1	н. п.
185	LKAVPSQKRT	1	н. п.
186	SLIAVFQKY	1	B*15
	HAL гистидин-аммоний-лиаза	3 [20,0%]	
187	ПКЕКTVVY	1	B*15
188	LLEQKVWEV	1	A*02
189	SEIAESHRF	2	B*44:25
190	YLAIGIHEL	1	A*02

191	PRIM1 праймаза, ДНК, полипептид 1 (49 кДа)	3 [20,0%]	
	IHDELQSF	3	B*38
192	RENBP ренин-связывающий белок	3 [20,0%]	
	AHVIDKFL	2	B*38
193	KAGGEFLRY	1	A*32
	CCNG1 циклин G1	3 [20,0%]	
194	FEVKDLLSL	1	B*49:01
195	FSKAKPSVL	2	A*02, B*51
	ZNF131 белок с доменом zinc finger 131	3 [20,0%]	
196	EAIKALEV	1	A*02:01
197	EVASAKQSVKY	1	A*26
198	IEFTYTAKL	1	B*49:01
199	LLADITSKY	1	B*15
	HRSP12 термочувствительный белок 12	3 [20,0%]	
200	VLVDRTIYI	3	A*02
	EIF6 эукариотический фактор инициации трансляции 6	3 [20,0%]	
201	IPVVHASI	1	B*51:01
202	TVADQVLVGSY	1	A*26:01
203	VALVHPDL	1	н. п.
	TMPRSS3 трансмембранная протеаза, серин 3	3 [20,0%]	
204	LPDDKVTAL	3	C*03, C*12:41
	UBE2G2 убиквитин-конъюгирующий фермент E2G 2	3 [20,0%]	
205	KIAKQIVQK	1	A*03
206	VEKILLSVV	2	B*49:01
	NOP14 NOP14 ядрышковый белок	3 [20,0%]	
207	APAGARGGPA	1	B*07
208	EHLRKLEAE	1	н. п.
209	RFIPELINF	1	A*23:01
	TFCP2 фактор транскрипции CP2	3 [20,0%]	
210	TEKIAQLF	1	B*18:01
211	KLHDETLTY	1	A*03
212	LHDETLTYL	1	B*38:01
	TARBP1 TAR РНК (ВИЧ-1)-связывающий белок 1	3 [20,0%]	
213	GPQEGNGPSLF	1	B*35:01
214	YLLQRAVEV	2	A*02
	TTLL12 семейство тубулинтирозинлигаза-подобного белка, член 12	3 [20,0%]	
215	FAALHGPA	2	A*02
216	RMANLMGIEF	1	B*15
	HLX H2.0 -подобный гомеобокс	3 [20,0%]	
217	DTFPGPYAVL	2	A*26
218	DTMPQTYKR	1	A*66
	CBX2 гомолог хромобокса 2	3 [20,0%]	
219	IEHVFVTDV	2	B*49:01
220	KESPTSVGF	1	B*40
	ZNF638 белок с доменом zinc finger 638	3 [20,0%]	

221	EAITAIMKY	1	A*26
222	KEKPAENTL	1	B*44:03
223	NEFQSQQNI	1	B*49:01
224	NVIDYGHASKY	1	A*32
225	C3AR1 рецептор 1 компонента 3а системы комплемента FAKSQSKTF	3 [20,0%] 2	A*03, A*32
226	LPFSLAHL TAF9 TAF9 РНК-полимераза II, фактор, ассоциированный с TATA бокс-связывающим белком (TBP)	1 3 [20,0%]	B*51:01
227	APNYRLKSL	1	B*07
228	ILKDMGITEY	2	A*66, A*32
229	FSCN1 гомолог фасцина 1; белок, связывающий актин в пучки AHDDGRWSL	3 [20,0%] 1	B*38
230	KYLTAEAAGF	2	A*23:01
231	ZNF805 белок с доменом zinc finger 805 ESAALIHNY	3 [20,0%] 2	A*26
232	YQRETPQV	1	B*52:15
233	CLEC12A семейство лектинового домена C-типа 12, член A EELQRNISL	3 [20,0%] 1	B*44:25
234	RPAALFLTL	1	B*07
235	SEELQRNISL	1	B*40
236	SLX4IP белок, взаимодействующий с SLX4 ETIDSRVQEY	3 [20,0%] 3	A*26
237	RLTPR мотив RGD, содержащий богатые лейцином повторы, домен тропомодулина и богатый пролином EVSEQILHM	3 [20,0%] 3	A*26
238	RNF19B белок с доменом ring finger 19B GTLSSGILSSGK	3 [20,0%] 1	A*03
239	GVPIMLAY	2	н. п.
240	DDX46 DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp)-бокс полипептид 46 EEVKEEVKKF	3 [20,0%] 2	B*44:25, B*44:03
241	KTIAFLLPMF	1	A*32
242	LRRC8D семейство белков, содержащих богатый лейцином повтор 8, член D EVTTNIPKM	3 [20,0%] 3	A*26
243	C16orf62 белок, кодируемый открытой рамкой считывания 62 хромосомы 16 IHGDTVQNQL	3 [20,0%] 2	B*38:01
244	RTMVKTLEY	1	A*03:01
245	GOLGA7 гольджин A7 ETVRTLNLY	3 [20,0%] 3	A*26
	RHOT1 член семейства гомологов ras T1	3 [20,0%]	

246	HSIDKVTSR	2	A*66
247	VSNPKSFEY	1	A*32
	BBS1 белок 1 синдрома Барде-Бидля	3 [20,0%]	
248	GLGPTFKL	1	A*02:01
249	NKGISDIHKV	1	н. п.
250	TSTTRPVL	1	A*32
	CEP76 центросомный белок 76 кДа	3 [20,0%]	
251	VLGGKAFLEHL	1	A*02
252	YEFERTTSI	2	B*49:01
	GANC глюкозидаза, альфа; нейтральный C	3 [20,0%]	
253	YLDFTNPKV	3	A*02
	ATP8B4 АТФаза, I класса, типа 8B, член 4	3 [20,0%]	
254	IPAVARTTTL	1	B*07
255	KQQLELDSI	1	B*15
256	KTTDTVSSF	1	A*32
	PPIL4 пептидилпролилизомераза (циклофилин)- подобный 4	3 [20,0%]	
257	DYLDGVHTVF	2	A*23:01
258	YLDGVHTVF	1	B* 15:01
	HPT1 холинфосфотрансфераза 1	3 [20,0%]	
259	TYVSGMLRF	1	A*23:01
260	DAIDGKQAR	2	A*66
	CHTF18 CTF18, гомолог фактора правильности передачи хромосом 18	3 [20,0%]	
261	DPMAPGVQGSLL	1	A*26:01
262	GLDPSQRPK	2	A*03
	DGCR8 DGCR8 субъединица комплекса микропроцессора	3 [20,0%]	
263	IEDSRVYEL	3	B*49:01, B*40
	ANKS1A белок 1A, содержащий анкириновый повтор и домен стерильного альфа-мотива	3 [20,0%]	
264	YVHSFLSSGY	3	A*26, A*03:01
	TOP1MT топоизомераза (ДНК) I, митохондриальная	3 [20,0%]	
265	HEYTTKEVF	1	B*18:01
266	KLQEQLAQL	1	A*02:01
267	SIAAKILSY	1	A*03:01
	PHACTR3 регулятор фосфатазы и актина 3	3 [20,0%]	
268	KELLAVKL	1	B*49:01
269	KLKQTTSALEK	2	A*03
	CCDC115 белок, содержащий биспиральный домен 115	3 [20,0%]	
270	EVGPREGALR	2	A*66
271	SEAQEGQLQKF	1	B*44:25
	SORCS2 рецептор 2, содержащий домен VPS10, относящийся к сортилину	3 [20,0%]	
272	DEAVLFVQV	3	B*18:01, B*40

	ACCS гомолог 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатсинтазы	3 [20,0%]	
273	EVAKFLSFY	2	A*26
274	KLDQKLPEL	1	A*02:01
275	SVFEKSVGY	1	A*26:01
	ACBD6 белок 6, содержащий домен, связывающийся с ацил-КоА	3 [20,0%]	
276	NEGQTALHY	1	B*44:03
277	VEFPHSPEI	2	B*49:01
	ORAI3 депо-управляемый белок ORAI 3 — модулятор внутриклеточного кальция	3 [20,0%]	
278	RLQGELQAV	3	A*02
	SIKE1 супрессор IKBKE 1	3 [20,0%]	
279	KELRELLSI	1	B*49:01
280	SLVDQSAAL	1	A*02:01
281	LELIMSKY	1	B*18:01
	C9orf156 белок, кодируемый открытой рамкой считывания 156 хромосомы 9	3 [20,0%]	
282	DIKPYYAEY	3	A*26
	EDEM2 белок 2, усиливающий деградацию ЭР, альфа-маннозидаза-подобный 2	3 [20,0%]	
283	KLMAMFLEY	1	A*03:01
284	YTVEKREGY	2	A*26
	NUP85 нуклеопорин 85 кДа	3 [20,0%]	
285	FEFDIHQVI	2	B*49:01
286	SENPSKHDSF	1	B*44:25
	PANK2 пантотенаткиназа 2	3 [20,0%]	
287	NFLRINTI	1	C*02
288	YSGPTSVSR	1	A*66
289	DIYGGDYERF	1	A*26:01
	SPATC1L белок 1, подобный ассоциированному со сперматогенезом и центриолями	3 [20,0%]	
290	SARLEKLGY	1	B*15
291	YVFPGVTRL	1	A*02
292	YYLNEIQSF	1	A*23:01
	IKZF4 белок с доменом zinc finger 4 семейства IKAROS	3 [20,0%]	
293	YHSQDRYEF	3	B*39:01
	DHX33 DEAH (Asp-Glu-Ala-His)-бокс-содержащий полипептид 33	3 [20,0%]	
294	FPPGRQVVM	2	C*12:03
295	ILDEAHERTI	1	A*02
	METTL7A метилтрансфераза-подобный 7A	3 [20,0%]	
296	VIYNEQMASK	3	A*03
	QTRTD1 белок 1, содержащий домен квеун-тРНК-рибозилтрансферазы	3 [20,0%]	
297	EATSIKVR	2	A*66
298	LPEDKPRLI	1	B*51:01
	TMBIM4 трансмембранный белок 4, содержащий мотив BAX-ингибитора	3 [20,0%]	

299	KYPLNLYLL	2	A*23:01, A*24
300	VHESPALILLF	1	B*38
	RAVER2 рибонуклеопротеин, РТВ-связывающий	3 [20,0%]	
	2		
301	EVTGHSKGY	2	A*26
302	RDSEELLQI	1	B*40
303	SPASKTTL	1	B*07
	SDAD1 белок 1, содержащий домен SDA1	3 [20,0%]	
304	DAKTVNVI	1	B*51:01
305	DSNATAAKM	1	н. п.
306	RTLNPQMLQK	1	A*03
307	RTLNPQMLQKK	1	A*03
	UCKL1 белок 1, подобный уридинцитидинкиназе	3 [20,0%]	
	1		
308	LMAEMGVHSV	1	A*02
309	RLLPPVGTGR	1	A*03
310	VRIGTILIQTNQ	1	н. п.
	STMN3 белок 3, подобный статмину	3 [20,0%]	
311	KELSVLSLI	1	B*49:01
312	TQHPNNTVY	2	B*15
	CHIC2 богатый цистеином гидрофобный домен 2	3 [20,0%]	
313	ALEEQLLKY	3	A*26:01, A*03:01
	ODF2L подобный наружному слою плотных волокон хвоста сперматозоидов 2	3 [20,0%]	
314	DHFTGAIEKL	2	B*38
315	KILDLETEL	1	A*02:01
	PRR12 богатый пролином 12	3 [20,0%]	
316	AEDIPSLKL	2	B*40, B*44:25
317	DIPSLKLAL	1	A*26
318	GLDPNKPPEL	1	A*02
	FARSA фенилаланил-тРНК синтетаза, альфа- субъединица	3 [20,0%]	
319	FLRDPAEAL	1	A*02
320	GYGSQGYKY	1	A*29
321	KLLAEVTLK	1	A*03:01
322	SAADGPRVF	1	A*32
	CTDP1 CTD (карбокси-терминальный домен, РНК полимеразы II, полипептид A) фосфатаза, субъединица 1	3 [20,0%]	
323	KLYELHVFTF	1	B*15
324	YELHVFTF	1	B*18:01
325	YLNKEIEEA	1	A*02

В таблице показаны опухолеассоциированные антигены, образованные из лигандома HLA I класса (LiTAA) с частотой представленности $\geq 20\%$ у пациентов с ОМЛ (n=15) и

презентируемые HLA-лиганды (LiTAP), указанные с соответствующей рестрикцией по HLA. Сокращения: предст., представленность; н. п., не присвоено

Таблица 2: Дополнительные пептиды по настоящему изобретению, относящиеся к базовым антигенам, описанным как связанные с ОМЛ

SEQ ID NO	Белки, пептиды	Число положительных здоровых доноров (МКПК/МККМ) [Частота предст. %]	Число ОМЛ-положительных [Частота предст. %]	HLA
326	NPM1 нуклеофосмин DENEHQLSL	17[56,7] / 1[20,0] 1/0	9[60,0] 3	B*18, B*40, B*44, B*44:25
327	EITPPVVLRL	5/1	0	A*68,A*28, A*32
328	GFEITPPVVLRL	4/1	0	A*68, A*28
329	HQLSLRTV	2/0	0	B*13, B*52
330	MSVQPTVSL	0/0	1	C*03
331	SIRDTPAKN	0/0	1	н. п.
332	SIRDTPAKNAQK	1/0	1	A*11
333	SPIKVTLATL	3/0	0	B*07
334	TPPVVLRL	6/0	2	B*51
335	VEAKFINY	0/0	1	B*18:01
336	YEGSPIKV	0/0	1	B*49:01
337	YEGSPIKVTL	3/0	3	B*40:01
	FLT3, fms-связанная тирозинкиназа 3	0[0,0] / 0 0,0]	1[6,7]	
338	SELKMMTQL	0/0	1	B*40
	PRAM1 PML-RARA-регулируемая адапторная молекула 1	4[13,3] / 1[20,0]	3[20,0]	
339	EKDPQPQQL	1/0	0	н. п.
340	GYVPRTAL	1/0	0	A*24
341	KEKDPQPQQL	0/0	1	B*44:25
342	LPKKPSKLEL	1/0	1	B*07
343	RPSAASIDL	0/1	1	B*07
344	SRHPLSPGF	0/0	1	B*27:05
	BCL2 В-клеточный ХЛЛ/лимфома 2	1 [3,3] / 1[20,0]	2 [13,3]	
345	TPRSPQPEL	0/1	1	B*07
346	GRIVAFFEF	0/0	1	B*27:05
347	HTHPAASR	1/0	0	A*33

SEQ ID NO	Белки, пептиды	Число положительных здоровых доноров (МКПК/МККМ) [Частота предст. %]	Число ОМЛ-положительных [Частота предст. %]	HLA
	BRAP BRCA1-ассоциированный белок	1[3,3] / 1[20,0]	4 [26,7]	
348	NPDELKTTV	1/0	0	н. п.
349	PSKQLPDQI	0/1	0	н. п.
350	VYVERAEVL	3/0	1	A*24
	NUDCD1 белок 1, содержащий домен NudC	6[20,0] / 0[0,0]	4 [26,7]	
351	DPFIIIHSI	5/0	2	B*51
352	EHSIATLLL	1/0	2	B*38, B*39
	CYP1B1 цитохром P450, семейство 1, подсемейство B, полипептид 1	6[20,0] / 1[20,0]	1 [6,7]	
353	FLDPRPLTV	6/1	1	A*02
354	SAFADRPAF	1/0	0	н. п.
	HMMR рецептор гиалуронан-опосредованной подвижности (RHAMM)	1[3,3] / 0[0,0]	2 [13,3]	
355	DTTLPASAR	0/0	1	A*66
356	KLLEYIEEI	0/0	1	A*02
357	LEKQLIEL	1/0	0	н. п.
	TERT теломераза - обратная транскриптаза	2[6,6] / 0[0,0]	0[0,0]	
358	LMSVYVVEL	2/0		A*02
	MCL1 последовательность 1, клетки миелоидного лейкоза	15[50] / 0[0,0]	5[33,3]	
359	ESITDVLVR	3/0	2	A*66
360	ETAFQGMLR	0/0	1	A*66
361	EVPDVTATPARL	1/0	0	н. п.
362	GRIVTLISF	3/0	1	B*27
363	HVFSDGVTNW	2/0	0	A*25
364	REIGGGEAGAVI	1/0	0	B*49
365	RGWDGFVEF	0/0	1	A*32
366	RPAVLPLL	1/0	0	B*07
367	VEFFHVEDL	3/0	2	B*40, B*52, B*60

SEQ ID NO	Белки, пептиды	Число положительных здоровых доноров (МКПК/МККМ) [Частота предст. %]	Число ОМЛ-положительных [Частота предст. %]	HLA
368	VQRNHETAF	3/0	2	B*15, B*62
	DNAJC2 DnaJ (Hsp40) гомолог, подсемейство C, член 2	1[3,3] / 0[0,0]	0[0,0]	
369	AELEAARL	1/0	0	B*44
	NUSAP1 белок 1, ассоциированный с ядрышком и веретеном деления	2[6,6] / 2[40,0]	5[33,3]	
370	ATQTPVSNK	0/1	1	A*11
371	ESIDQYIER	1/1	2	A*33, A*66, A*68
372	FEEHNSMNEL	1/0	1	B*40
373	SVASTPISQR	0/1	1	A*68
374	VASTPISQR	0/1	0	A*68
	PRTN3 протеиназа 3	2[6,6] / 4[80,0]	2[13,3]	
375	AEIVGGHEA	2/2	1	B*50, B*49
376	RPPSPALASV	0/1	0	B*07
377	SVAQVFLNNY	0/1	0	A*03
378	TQEPTQQHF	0/1	1	B*15
	RGS5 регулятор сигналов G-белка 5	1[3,3] / 0[0,0]	2[13,3]	
379	KDITmKNLV	1/0	0	н. п.
380	mAEKAKQIY	0/0	2	н. п.
	SSX2IP синовиальная саркома, белок, взаимодействующий с точкой разрыва X 2	8[26,7] / 0[0,0]	0 [0,0]	
381	KLDNQVSKV	6/0	0	A*02
382	SENVKLFSA	1/0	0	н. п.
383	VQKLQNII	1/0	0	B*13

	WT1 белок опухоли Уильмса 1	10[33,3] / 0[0,0]	3[20,0]	
384	AFTVHFSGQF	0/0	2	A*23
385	GVFRGIQDV	0/0	1	A*02:01
386	QRNMTKLQL	1/0	0	н. п.
387	RmFPNAPYL	9/0	1	A*02:01, E
	MAGED1 семейство антигена меланомы D, 1	15[50,0] / 3[60,0]	6[40,0]	
388	EAAAEAKAR	1/0	1	A*66

SEQ ID NO	Белки, пептиды	Число положительных здоровых доноров (МКПК/МККМ) [Частота предст. %]	Число ОМЛ-положительных [Частота предст. %]	HLA
389	IIKEYTDVY	1/0	0	B*15:01
390	KEIDKNDHL	1/0	0	B*40:01
391	KVSKASGVSK	2/0	1	A*03
392	MPATETKKV	1/0	0	B*07
393	NADPQAVTm	5/0	0	A*02
394	RSDmLKDI	0/0	1	н. п.
395	SESGAGLTRF	0/0	1	B*44:25
396	SMMQTLLTV	1/0	0	A*02
397	TEVSKTPEA	4/2	3	B*49:01
398	VEVPETPKA	2/1	1	B*50
399	DVYPEIER	6/1	2	A*66, A*68
	AURKA киназа Aurora A	0[0,0] / 0[0,0]	1[6,7]	
400	REVEIQSHL	0/0	1	B*49:01
	CCNA1 циклин A1	0[0,0] / 0[0,0]	2[13,3]	
401	EPPAVLLL	0/0	1	B*51:01
402	LEADPFLKY	0/0	1	B*18:01
	MUC1 муцин 1, ассоциированный с клеточной поверхностью	1[3,3] / 0[0,0]	0 [0,0]	
403	TTQGQDVTLA	1/0	0	н. п.
	MPO	0[0,0] / 3[60,0]	6[40,0]	
	миелопероксидаза			
404	AEYEDGFSIP	0/1	0	B*50
405	AQISLPRI	0/1	0	B*13
406	DFTPEPAAR	0/0	2	A*66
407	DNTGITTYSK	0/1	0	A*68
408	EEAKQLVDKAY	0/0	1	B*44
409	ERRESIKQ	0/0	1	н. п.
410	ETVGQLGTVLR	0/1	1	A*66, A*68
411	FEQVMRIGL	0/0	1	B*40
412	FSMQQRQAL	0/0	1	C*03
413	GVPFFSSLR	0/1	1	A*66, A*68
414	IVRFPTDQL	0/1	1	A*02
415	KQPVAATRATV	0/0	1	B*15
416	LGASNRAFV	0/1	0	н. п.
417	NPRWDGERL	0/0	1	B*07
418	NVFTNAFRY	0/0	1	A*29
419	QPMENPRVPL	0/0	1	B*07
420	QPVAATRATV	0/1	0	B*07
421	RLFQVMRI	0/0	2	A*02

SEQ ID NO	Белки, пептиды	Число положительных здоровых доноров (МКПК/МККМ) [Частота предст. %]	Число ОМЛ-положительных [Частота предст. %]	HLA
422	SEEPLARNL	0/0	1	B*40
423	TIRNQINAL	0/0	1	A*02
424	VLGPTAMRK	0/1	0	A*03
	RUNX1 фактор транскрипции 1 с runt-доменом	2[6,6] / 0[0,0]	4[26,7]	
425	AELRNATAA	1/0	0	н. п.
426	DVPDGTLVTVm	1/0	3	A*26
427	LPIAFKVV	1/0	1	B*51
428	SAMGSATRY	0/0	1	A*32
	NUP214 нуклеопорин 214 кДа	2[6,6] / 0[0,0]	3[20,0]	
429	AEKQGHQW	1/0	0	B*44
430	GEQKPTGTF	0/0	1	B*44:25
431	GQFSKPFSF	1/0	0	B*15:01
432	IAFFDVRTF	0/0	1	C*12:03
433	LSAGKTSFSF	0/0	1	C*03
434	VSNKYGLVF	1/0	0	B*58
	CCNB1 циклин B1	2[6,6] / 0[0,0]	3[20,0]	
435	GEVDVEQHTL	2/0	2	B*40:01
436	VDVEQHTL	0/0	1	B*40:01
	HOXA9 гомеобокс A9	0[0,0] / 0[0,0]	1[6,6]	
437	DAADELSVGRY	0/0	1	A*26:01
	MSLN мезотелин	0[0,0] / 0[0,0]	1[6,6]	
438	LSEADVRA	0/0	1	н. п.
	BIRC5 сурвивин	2[6,6] / 0[0,0]	3[20,0]	
439	ELTLGEFLK	2/0	2	A*68
440	ELTLGEFLKL	1/0	2	A*02
441	LTLGEFLK	1/0	1	н. п.
442	LTLGEFLKL	1/0	1	A*02
443	TLGEFLKL	1/0	2	A*02
	KLF2 крупнель-подобный фактор 2	5[16,7] / 0[0,0]	4[26,7]	
444	KTYTKSSHLLK	5/0	4	A*03
	PRAME антиген, преимущественно экспрессируемый в клетках меланомы	1[3,3] / 0[0,0]	0[0,0]	
445	SQLTTLSFY	1/0	0	B*15
	PASD1 белок 1, содержащий pas-домен	0[0,0] / 0[0,0]	2[13,3]	
446	KMQEKKKLQ	0/0	1	н. п.
447	LLGHLPAEI	0/0	1	B*51

В таблице показаны презентируемые HLA-лиганды, полученные из известных ОМЛ-ассоциированных антигенов, вместе с информацией об источнике образца, частотой представленности в различных тканях (15 образцов ОМЛ, 30 образцов МКПК, 5 образцов МККМ) и соответствующей рестрикцией по HLA. Сокращения: предст., представленность; н. п., не присвоено.

Пептиды из следующей Таблицы 3, кроме того, полезны для постановки диагноза и/или лечения гематологических злокачественных заболеваний, ОМЛ и/или хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), предпочтительно, тем не менее, ОМЛ.

Таблица 3: Пептиды, связанные с молекулами МНС II класса, по настоящему изобретением

SEQ ID NO	Белок/пептиды	Число ОМЛ-положительных [Частота предст.]
	A1BG альфа-1-В гликопротеин	6 [50%]
448	APVELILSDETLPAPE	3
449	ETPDFQLFKNGVAQEPV	1
450	LAPLEGARFALVRED	2
451	SPDRIFHLNAVALGD	1
452	SPDRIFHLNAVALGDG	2
	CORO1A коронин, актин-связывающий белок, 1A	5 [41,7%]
453	EEMRKLQATVQELQKR	1
454	EEPLSLQELDTSSG	4
455	EMRKLQATVQELQKR	1
456	HLEEPLSLQELDTSSG	1
457	LEEPLSLQELDTSSG	2
	RPS5 рибосомный белок S5	5 [41,7%]
458	AGTVRRQAVDVSPLR	5
459	IGRAGTVRRQAVDVSPLR	1
460	RAGTVRRQAVDVSPLR	4
461	TVRRQAVDVSPLR	1
	C19orf10 белок, кодируемый открытой рамкой считывания 10 хромосомы 19	5 [41,7%]
462	GVVHSFSHNVGPGDK	2
463	GVVHSFSHNVGPGDKY	1
464	GVVHSFSHNVGPGDKYT	1
465	KTEEFVTKTAVAHRP	1
466	KTEEFVTKTAVAHRPG	3
467	VRPGGVVHSFSHNVGPGDK	1
468	VRPGGVVHSFSHNVGPGDKYT	1
	PLIN3 перилиппин 3	4 [33,3%]
469	AEKGVRTLTAAGVSGAQ	1
470	AQPILSKLEPQIASASE	1

SEQ ID NO	Белок/пептиды	Число ОМЛ-положительных [Частота предст.]
471	EKGVRTLTAAAVSGAQ	3
472	EKGVRTLTAAAVSGAQP	1
473	GVRTLTAAAVSGAQ	1
474	KGVRTLTAAAVSGAQ	1
	CLSTN1 кальсинтенин 1	4 [33,3%]
475	DVNEYAPVFKEKSYK	1
476	HRSFVDLSGHNLA	1
477	HRSFVDLSGHNLANPH	1
478	HRSFVDLSGHNLANPHP	3
	HSP90B1 белок теплового шока 90 кДа бета (Grp94), член 1	4 [33,3%]
479	ALPEFDGKRFQNVAK	1
480	DSNEFSVIADPRG	1
481	DSNEFSVIADPRGN	1
482	DSNEFSVIADPRGNT	1
483	DSNEFSVIADPRGNTL	1
484	DSNEFSVIADPRGNTLG	1
485	PEFDGKRFQNVAK	1
486	SDSNEFSVIADPRGNTLG	1
487	SQKKTFEINPRHPLIR	1
488	ALPEFDGKRFQNVAK	1
489	PEFDGKRFQNVAK	2
490	PEFDGKRFQNVAKE	1
	B4GALT1 УДФ-галактоза:D-глюкозо-1,4-галактозилтрансфераза, полипептид 1	4 [33,3%]
491	LNSLTYQVLDVQRYYP	1
492	LPQLVGVSTPLQG	2
493	LPQLVGVSTPLQGG	1
494	LPQLVGVSTPLQGGG	3
495	RLPQLVGVSTPLQGGG	1
496	SDVDLIPMNDHNAYR	1
	SPN сиалофорин	4 [33,3%]
497	GRRKSRQGSLAMEELK	1
498	RKSRQGSLAMEELK	3
499	SGPSLKGEELPLVASEDGAVD	1
500	SGSGPSLKGEELPLVASEDGAVD	1
	METAP1 метиониламинопептидаза 1	4 [33,3%]
501	IKPGVTTEEIDHAVH	4
502	KPGVTTEEIDHAVH	3
	HSPG2 гепарансульфат-протеогликан 2	4 [33,3%]
503	DGVLRIQNLDQS	4
504	GAYFHDDGFLAFPG	1
505	TPYSFLPLPTIKDAYR	1
506	YTPDISWSKLDGSLPP	1
507	YTPDISWSKLDGSLPPD	1
	QSOX1 квиесцин Q6 сульфгидрилоксидаза 1	3 [25,0%]
508	ASHFEQMAAASMHR	3
	MANBA маннозидаза, бета А, лизосомная	3 [25,0%]

SEQ ID NO	Белок/пептиды	Число ОМЛ-положительных [Частота предст.]
509	GGQVIVAIPKLQTQQ	1
510	GQVIVAIPKLQTQ	1
511	GQVIVAIPKLQTQQ	1
512	IESTFDVVSSKPVG	2
	CREG1 клеточный репрессор E1A-стимулированных генов 1	3 [25,0%]
513	DWGALATISTLEAVRG	1
514	GRPFADVLSLSDGPPG	1
515	WGALATISTLEAVR	2
516	WGALATISTLEAVRG	2
	LDHA лактат-дегидрогеназа A	3 [25,0%]
517	ADELALVDVIEDK	1
518	GVSLKTLHPDLGTDK	2
519	IVSGKDYNVTANSKL	1
	CP церулоплазмин (ферроксидаза)	3 [25,0%]
520	DDNIKTYS DHPEK	1
521	DKVYVHLKNLASRPY	1
522	GDKVYVHLKNLASRPY	1
523	LDDNIKTYS DHPEK	1
524	TGDKVYVHLKNLASRPY	1
525	VYVHLKNLASRPY	1
	COL1A1 коллаген, тип I, альфа 1	3 [25,0%]
526	KTSRLPIIDVAPLDVGAPD	1
527	KTSRLPIIDVAPLDVGAPDQE	1
528	LPIIDVAPLDVGAPD	1
529	RLPIIDVAPLDVGAPD	3
530	RLPIIDVAPLDVGAPDQE	2
531	SRLPIIDVAPLDVGAPD	1
532	SRLPIIDVAPLDVGAPDQE	1
533	TSRLPIIDVAPLDVGAPD	1
534	TSRLPIIDVAPLDVGAPDQE	1
	CRP С-реактивный белок, семейства пентраксинов	3 [25,0%]
535	DTSYVSLKAPLT	2
536	DTSYVSLKAPLTKP	1
537	DTSYVSLKAPLTKPL	1
538	ESDTSYVSLKAPLT	2
539	ESDTSYVSLKAPLTKPL	1
540	SDTSYVSLKAPLT	3
541	SDTSYVSLKAPLTKP	2
542	SDTSYVSLKAPLTKPL	2
	APRT аденин-фосфорибозилтрансфераза	3 [25,0%]
543	DPASFRAAIGLLARH	3
	MBL2 манноза-связывающий лектин 2	3 [25,0%]
544	TEGQFVDLTGNRLTYT	3
	IFI30 гамма-интерфероном индуцируемый белок 30	3 [25,0%]
545	ALDFFGNGPPVNYK	1

SEQ ID NO	Белок/пептиды	Число ОМЛ-положительных [Частота предст.]
546	ALDFFGNGPPVNYKTG	1
547	DFFGNGPPVNYKTG	2
548	LDFFGNGPPVNYK	1
549	LDFFGNGPPVNYKTG	1
550	QALDFFGNGPPVNYKTG	1
	LBP липополисахарид-связывающий белок	3 [25,0%]
551	AISDYVFNTASLVYH	1
552	AISDYVFNTASLVYHEE	2
553	ISDYVFNTASLVYH	1
554	ISDYVFNTASLVYHEE	3
555	YVFNTASLVYHEE	1
	RAB5A RAB5A, член семейства онкогенов RAS	3 [25,0%]
556	IVIALSGNKADLA	1
557	SPNIVIALSGNKADL	1
558	SPNIVIALSGNKADLA	3
	ICAM3 межклеточная молекула адгезии 3	3 [25,0%]
559	TPPRLVAPRFLEVE	1
560	TPPRLVAPRFLEVET	1
561	TPPRLVAPRFLEVETS	3
	MAN1A1 маннозидаза, альфа, класс 1A, член 1	3 [25,0%]
562	EIQRDILLEKKKVAQDQ	1
563	FGAIFFLPDSSK	1
564	IQRDILLEKKKVAQ	1
565	IQRDILLEKKKVAQD	1
566	IQRDILLEKKKVAQDQ	1
567	LSGVLFHSSPALQPA	1
568	RDILLEKKKVAQDQ	1
569	SSKLLSGVLFHSSPA	1
570	SSPALQPAADHKPGPG	1
	RBMX белок с РНК-связывающим мотивом, X-связанный	3 [25,0%]
571	APPTRGPPPSYGGG	1
572	GNSRSAPPTRGPPPSYGGSSRY	1
573	RDYGHSSSRDDYPS	1
574	SPRDDGYSTKDSY	1
	PBX2 гомеобокс 2 лейкоза из клеток-предшественников В-лимфоцитов	3 [25,0%]
575	GGSAIAAAAAAAAAASGG	1
576	DNMLLAEGVSGPEK	2
	YARS тирозил-тРНК-синтаза	3 [25,0%]
577	ADSLYVEKIDVGAEPR	3
	TPM4 тропомиозин 4	3 [25,0%]
578	RIQLVEEELDRAQER	2
579	RRIQLVEEELDRAQER	1
	RPL36A рибосомный белок L36a	3 [25,0%]
580	HQPHKVTQYKKGKDSLY	2
581	RKKAKTTKKIVL	1
	GANAB глюкозидаза, альфа; нейтральная AB	3 [25,0%]

SEQ ID NO	Белок/пептиды	Число ОМЛ-положительных [Частота предст.]
582	DVFRQYASLTGTQALPP	1
583	GTAQGELFLDDGHT	1
584	VFRQYASLTGTQALPP	1
	HSP90B2P белок теплового шока 90 кДа бета (Grp94), член 2, псевдоген	3 [25,0%]
585	PEFDGKRFQNVAK	1
586	PEFDGKRFQNVAKE	2
587	ALPEFDGKRFQNVAKEG	1
	LAIR1 ассоциированный с лейкоцитами иммуноглобулин-подобный рецептор 1	3 [25,0%]
588	ASPSESEARFRIDSVSEGNAGPY	1
589	EARFRIDSVSEGNAGP	1
590	ESEARFRIDSVSEGNAGP	1
591	ESEARFRIDSVSEGNAGPY	1
592	FRIDSVSEGNAGP	1
593	FRIDSVSEGNAGPY	1
594	SEARFRIDSVSEGNAGPY	3
595	SPSESEARFRIDSVSEGNAGPY	1
	GALNT7 УДФ-N-ацетил-альфа-D-галактозамин: полипептид N-ацетилгалактозаминилтрансфераза 7 (GalNAc-T2)	3 [25,0%]
596	GNQLFRINEANQL	1
597	GNQLFRINEANQLMQ	2
598	SPAMAGGLFAIERE	1
	ARRDC1 белок 1, содержащий домен аррестина	3 [25,0%]
599	FIGNIAVNHAPVSPR	1
600	FIGNIAVNHAPVSPRPG	1
601	IGNIAVNHAPVSPRP	3
602	IGNIAVNHAPVSPRPG	1
	ERGIC1 белок эндоплазматического ретикулума-промежуточного компартмента гольджи (ERGIC) 1	3 [25,0%]
603	FEGQFSINKVPGNFH	3
604	FEGQFSINKVPGNFHVS	2
605	RFEGQFSINKVPGNFH	2

В таблице показаны опухолеассоциированные антигены, происходящие из лиганда HLA II класса (LiTAA) с частотой представленности >20% у пациентов с ОМЛ (n=12) и презентруемые HLA-лиганды (LiTAP). Сокращения: предст., представленность.

Пептиды из следующей Таблицы 4 полезны для постановки диагноза и/или лечения ОМЛ и/или ХЛЛ, но, предпочтительно, ОМЛ.

Таблица 4: Пептиды по настоящему изобретению, которые могут быть использованы для лечения как ОМЛ, так и ХЛЛ

SEQ ID NO:	Последовательность
448	APVELILSDETLPAPE
520	DDNIKTYS DHPEK
471	EKGVRTLTA AAVSGAQ
472	EKGVRTLTA AAVSGAQP
439	ELTLGEFLK
353	FLDPRPLTV
522	GDKVYVHLKNLASRPY
318	GLDPNKPPEL
178	HEIDRYTAI
68	IGVEHV VVY
201	IPVVHASI
474	KGVRTLTAAAVSGAQ
381	KLDNQVSKV
323	KLYELHVFTF
46	KLYPTLVIR
241	KTIAFLLPMF
450	LAPLEGARFALVRED
357	LEKQLIEL
491	LNSLTYQVLDVQRY P
492	LPQLVGVSTPLQG
493	LPQLVGVSTPLQGG
494	LPQLVGVSTPLQGGS
441	LTLGEFLK
442	LTLGEFLKL
498	RKSRQGSLAMEELK
495	RLPQLVGVSTPLQGGS
354	SAFADRPAF
45	SEETFRFEL
382	SENVKL FSA
445	SQLTTL SFY
443	TLGEFLKL
202	TVADQVLVGSY
179	VFTLKPLEF
296	VIYNEQ MASK
383	VQKLQNII
525	VYVHLKNLASRPY
325	YLNKEIEEA
180	YWVPRNAL

Таким образом, наиболее предпочтительным является по меньшей мере один пептид по настоящему изобретению, выбранный из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 448, 520, 471, 472, 439, 353, 522, 318, 178, 68, 201, 474, 381, 323, 46, 241, 450,

357, 491, 492, 493, 494, 441, 442, 498, 495, 354, 45, 382, 445, 443, 202, 179, 296, 383, 525, 325 и 180, и его применение в лечении ОМЛ и/или ХЛЛ по настоящим описанием.

Настоящее изобретение относится далее к пептидам по настоящим изобретением для применения в лечении пролиферативных заболеваний, отличающихся от ОМЛ, таких как, например, ХЛЛ. Тем не менее, как показано в последующей Таблице 5, многие из пептидов по настоящим изобретением могут также применяться при других показаниях.

Таблица 5: Пептиды по настоящим изобретением и их конкретное применение при других пролиферативных заболеваниях, факультативно – в других органах.

Seq. ID	Последовательность	Пролиферативное заболевание и его локализация
1	AEQFRLEQI	толстый кишечник или прямая кишка, легкие, мелкоклеточная карцинома
2	FTAEFSSRY	толстый кишечник или прямая кишка, легкие, мелкоклеточная карцинома
3	HHDESVLTNVF	толстый кишечник или прямая кишка, легкие, мелкоклеточная карцинома
4	REQDEAYRL	толстый кишечник или прямая кишка, легкие, мелкоклеточная карцинома
5	RPVMPSRQI	толстый кишечник или прямая кишка, легкие, мелкоклеточная карцинома
6	VQREYNLNF	толстый кишечник или прямая кишка, легкие, мелкоклеточная карцинома
7	GQLPITIQV	почки, светлоклеточная почечно-клеточная карцинома, кости, неоссифицирующая фиброма
8	RAYADEVAV	почки, светлоклеточная почечно-клеточная карцинома, кости, неоссифицирующая фиброма
9	REDKPPLAV	почки, светлоклеточная почечно-клеточная карцинома, кости, неоссифицирующая фиброма
10	RVKDLDTEKY	почки, светлоклеточная почечно-клеточная карцинома, кости, неоссифицирующая фиброма
11	SEQEMNAHL	почки, светлоклеточная почечно-клеточная карцинома, кости, неоссифицирующая фиброма
12	YVLPLVHSL	почки, светлоклеточная почечно-клеточная карцинома, кости, неоссифицирующая фиброма
13	LPLRFWVNI	печень, гепатоклеточная карцинома, рак, поджелудочная железа, аденокарцинома

14	EVAEHVQYM	толстый кишечник или прямая кишка, предстательная железа, доброкачественная
15	YMAELIERL	толстый кишечник или прямая кишка, предстательная железа, доброкачественная
16	ALASLIRSV	нодулярная гиперплазия
17	TVAEITGSKY	щитовидная железа, нодулярная гиперплазия
18	EIIKRGIIIGY	щитовидная железа, нодулярная гиперплазия
19	NLVEKTPAL	толстый кишечник или прямая кишка, почки, карцинома
20	IEDKAQILL	толстый кишечник или прямая кишка, почки, карцинома
21	SIYDDSYLGY	злокачественная фиброзная гистиоцитома
22	TTNHPINPK	злокачественная фиброзная гистиоцитома
23	NAAILKKV	злокачественная фиброзная гистиоцитома
24	NYLDIKGLL	головной мозг, глиобластома, щитовидная железа, нодулярная гиперплазия
25	YLDIKGLLDV	головной мозг, глиобластома, щитовидная железа, нодулярная гиперплазия
26	EEVGDFIQRY	головной мозг, глиобластома, щитовидная железа, нодулярная гиперплазия
27	EVGDFIQRY	легкие, немелкоклеточная карцинома легких
28	MKDLSLGGVL	легкие, немелкоклеточная карцинома легких
29	DEFITVHSM	легкие, немелкоклеточная карцинома легких
30	EFITVHSM	желудок, кожа, базальноклеточная карцинома
31	GQLDVRELI	желудок, кожа, базальноклеточная карцинома
32	TQYIIHNY	желудок, кожа, базальноклеточная карцинома
33	EVVDVTWRY	желудок, кожа, базальноклеточная карцинома
34	KEALLRDTI	толстый кишечник или прямая кишка, лимфатический узел, неходжкинская лимфома
35	HGYENPTYK	толстый кишечник или прямая кишка, лимфатический узел, неходжкинская лимфома
36	SLLYKVPYV	толстый кишечник или прямая кишка, лимфатический узел, неходжкинская лимфома
37	AEIPLRMV	толстый кишечник или прямая кишка, лимфатический узел, неходжкинская лимфома
38	EVVYRFTAR	толстый кишечник или прямая кишка, лимфатический узел, неходжкинская лимфома

39	FPGLAIKI	желудок, метастатическая, аденокарцинома
40	IYNGKLFDL	желудок, метастатическая, аденокарцинома
41	IYNGKLFDLL	желудок, метастатическая, аденокарцинома
42	KEIDVISI	желудок, метастатическая, аденокарцинома
43	LEEQASRQI	желудок, метастатическая, аденокарцинома
44	TRMSTVSEL	желудок, метастатическая, аденокарцинома
45	SEETFRFEL	желудок, аденокарцинома, эндометрий, аденокарцинома
46	KLYPTLVIR	желудок, аденокарцинома, эндометрий, аденокарцинома
47	ALRNQATMVQK	желудок, аденокарцинома, неходжкинская лимфома, фунгоидный микоз
48	LLDHAPPEI	желудок, аденокарцинома, неходжкинская лимфома, фунгоидный микоз
49	GVLGTVVHGK	толстый кишечник или прямая кишка, печень, фокальная нодулярная гиперплазия
50	VQFIGRESKY	толстый кишечник или прямая кишка, печень, фокальная нодулярная гиперплазия
51	GQSLIHVI	паращитовидная железа, аденома
52	VHSPAGMAL	паращитовидная железа, аденома
53	VLYEGIKVGK	паращитовидная железа, аденома
54	AVIEAEKIAQV	яичник, гранулезоклеточная опухоль
55	DRIEUVNML	яичник, гранулезоклеточная опухоль
56	IEAEKIAQV	яичник, гранулезоклеточная опухоль
57	IEDLKAQIL	шейка матки, плоскоклеточная карцинома
58	YLLESVNKL	шейка матки, плоскоклеточная карцинома
59	HRIYVPLML	желудок, аденокарцинома диффузного подтипа, поджелудочная железа, аденокарцинома
60	KEYIPPLIW	желудок, аденокарцинома, поджелудочная железа, аденокарцинома
61	MDKLVVEY	желудок, аденокарцинома, поджелудочная железа, аденокарцинома
62	ALLGHILLH	почки, почечно-клеточная карцинома, несветлоклеточного типа
63	ALLPHLYTL	почки, почечно-клеточная карцинома, несветлоклеточного типа
64	HVAGETVAR	почки, почечно-клеточная карцинома, несветлоклеточного типа
65	KVWPGSTAF	почки, почечно-клеточная карцинома, несветлоклеточного типа
66	ETAVAILRF	метастатическая, инфильтрирующая лобулярная карцинома молочной железы
67	RVYNTDPLKEK	эндометрий, аденокарцинома,
68	IGVEHVVVY	головной мозг, рак, почки, онкоцитомы

69	RQIGVEHV	головной мозг, рак, почки, онкоцитома
70	DVFERPSAKK	почки, светлоклеточная почечноклеточная
71	EEFQFIKKA	карцинома, синовиальная саркома
72	THLVDQDTTSF	почки, светлоклеточная почечноклеточная
73	ESADLIQHY	карцинома, синовиальная саркома
74	EIIKEISIM	поджелудочная железа, аденокарцинома,
75	SVSDIIRLR	почки, почечноклеточная карцинома
76	AVSLIREEW	поджелудочная железа, аденокарцинома,
77	GEKSESISV	лимфатический узел, болезнь Ходжкина
78	FLTILPEEL	поджелудочная железа, аденокарцинома,
79	ILWETVPSM	лимфатический узел, болезнь Ходжкина
80	LPVRTLSI	желудок, аденокарцинома, лейкоциты,
81	RESEYKQVY	хронический лимфоцитарный лейкоз
82	SESLPVRTL	желудок, аденокарцинома, лейкоциты,
83	RLLESVVVL	хронический лимфоцитарный лейкоз
84	RPEEGKESL	поджелудочная железа, аденокарцинома,
85	THGKLVILF	легкие, аденокарцинома
86	KELEHLSHI	толстый кишечник или прямая кишка,
87	REMEYKEKI	метастатическая почечноклеточная
88	VLLSTIHEL	карцинома
89	KTYTKSSHLK	толстый кишечник или прямая кишка,
90	EIEKNFDY	метастатическая почечноклеточная
91	GTEEAPKVFK	карцинома
92	KLMAIPLVF	толстый кишечник или прямая кишка,
93	DIKRIGIPN	метастатическая почечноклеточная
		карцинома
		легкие, немелкоклеточная карцинома
		легких, селезенка, хронический
		миелоидный лейкоз
		легкие, немелкоклеточная карцинома
		легких, селезенка, хронический
		миелоидный лейкоз
		легкие, немелкоклеточная карцинома
		легких, селезенка, хронический
		миелоидный лейкоз
		желудок, аденокарцинома
		желудок, аденокарцинома
		желудок, аденокарцинома
		желудок, аденокарцинома, головной мозг,
		менингиома
		желудок, аденокарцинома
		желудок, аденокарцинома
		желудок, аденокарцинома
		желудок, аденокарцинома, легкие,
		мелкоклеточная карцинома

94	DIKRGIPNY	желудок, аденокарцинома, легкие, мелкоклеточная карцинома
95	FLDITNPKA	желудок, аденокарцинома дифференцированного типа, легкие, мелкоклеточная карцинома
96	ALYSVYRQK	почки, ангиомиолипома
97	KVLALVFGF	почки, ангиомиолипома
98	SFTDVIGHY	почки, ангиомиолипома
99	ASAAASGGLLK	толстый кишечник или прямая кишка, селезенка, экстрамедуллярный гемопоэз
100	ALLGVTGAPK	толстый кишечник или прямая кишка, селезенка, экстрамедуллярный гемопоэз
101	DEIKTLQRY	желудок, аденокарцинома, печень, карциноидная опухоль, метастатическая
102	EAYVQKMV	желудок, аденокарцинома, печень, карциноидная опухоль, метастатическая
103	VLHQDSGLGY	желудок, аденокарцинома, печень, карциноидная опухоль, метастатическая
104	YLQNHFVGL	желудок, аденокарцинома, печень, карциноидная опухоль, метастатическая
105	AEIEDIRVL	желудок, метастатическая, двенадцатиперстная кишка, аденокарцинома
106	GQSRLIFTY	желудок, метастатическая, двенадцатиперстная кишка, аденокарцинома
107	READFKETL	желудок, метастатическая, двенадцатиперстная кишка, аденокарцинома
108	DTMGPSQHVV	легкие, немелкоклеточная карцинома легких, селезенка, экстрамедуллярный гемопоэз
109	ESRGPALTR	легкие, немелкоклеточная карцинома легких, селезенка, экстрамедуллярный гемопоэз
110	FQLPGLGTPPIT	легкие, немелкоклеточная карцинома легких, селезенка, экстрамедуллярный гемопоэз
111	RIQGYVVSU	легкие, немелкоклеточная карцинома легких, селезенка, экстрамедуллярный гемопоэз
112	LLDPSVFHV	желудок, аденокарцинома, семенник, семинома
113	RFFHLADLF	желудок, аденокарцинома, семенник, семинома
114	DSISGNLQR	желудок, метастатический рак, кости, неоссифицирующая фиброма
115	ETEQTIQKL	желудок, метастатический рак, кости, неоссифицирующая фиброма
116	FLYPFLSHL	желудок, метастатический рак, кости, неоссифицирующая фиброма

117	TLDQKIERV	желудок, метастатический рак, кости, неоссифицирующая фиброма
118	DADSRAATV	печень, гепатоклеточная карцинома, почки, почечноклеточная карцинома
119	DHEGFGFVL	печень, гепатоклеточная карцинома, почки, почечноклеточная карцинома
120	GEAVKVL SI	печень, гепатоклеточная карцинома, почки, почечноклеточная карцинома
121	NATDLLKVL	печень, гепатоклеточная карцинома, почки, почечноклеточная карцинома
122	KEITEGKTV	желудок, метастатический рак, прямая кишка, аденокарцинома
123	YRQKQVVIL	желудок, метастатический рак, прямая кишка, аденокарцинома
124	VAINLIVQH	желудок, метастатический рак, прямая кишка, аденокарцинома
127	DAIKVFVRI	желудок, аденокарцинома, почки, опухоль Вильмса
128	LEKAFSEI	желудок, аденокарцинома, почки, опухоль Вильмса
129	MEKSDKNQ	желудок, аденокарцинома, почки, опухоль Вильмса
130	GQTGSGKTF	желудок, аденокарцинома, прямая кишка, аденокарцинома
131	DTSPDLSSR	легкие, немелкоклеточная карцинома легких, семенник, семинома
132	KLNEVIVNK	легкие, немелкоклеточная карцинома легких, семенник, семинома
133	FAQIISVALI	желудок, аденокарцинома, паразитовидная железа, аденома
134	IIFDRPLLY	желудок, аденокарцинома, паразитовидная железа, аденома
135	DAVNQNTKLL	яичник, аденокарцинома, светлоклеточного типа,
136	HHILADVSL	яичник, аденокарцинома, светлоклеточного типа,
137	YPSEKRGEL	яичник, аденокарцинома, светлоклеточного типа,
138	SVVDLINHY	головной мозг, глиобластома, кости, неоссифицирующая фиброма
139	EIEKDTKY	желудок, метастатический рак, легкие, крупноклеточная карцинома
140	ENEEKLKL	желудок, метастатический рак, легкие, крупноклеточная карцинома
141	ILGGPGTVQGV	печень, гепатоклеточная карцинома, рак, вульва, плоскоклеточная карцинома
142	ESAALIHNY	печень, гепатоклеточная карцинома, фиброматоз
143	YQRETPQV	печень, гепатоклеточная карцинома, фиброматоз
144	ARIEIGLHY	печень, фокальная нодулярная гиперплазия

145	IPYPRPIHL	печень, фокальная нодулярная гиперплазия
146	DVSGKTALNQ	почки, светлоклеточная почечноклеточная карцинома, желудок, гастроинтестинальная стромальная опухоль (ГИСО)
147	TEFRSLVI	почки, светлоклеточная почечноклеточная карцинома, желудок, гастроинтестинальная стромальная опухоль (ГИСО)
148	TLKSGDGITF	почки, светлоклеточная почечноклеточная карцинома, желудок, гастроинтестинальная стромальная опухоль (ГИСО)
149	HEADKTYML	желудок, аденокарцинома
150	KFFEEVLLF	желудок, аденокарцинома
151	RVMPSFFL	желудок, аденокарцинома
152	YELDLREPAL	легкие, немелкоклеточная карцинома легких, легкие, аденокарцинома
153	GAYGKVFLV	печень, гепатоклеточная карцинома, почки, ангиомиолипома
154	DHDLLKNF	почки, светлоклеточная почечно-клеточная карцинома, почки, поликистоз почек
155	EELQLIRQA	почки, светлоклеточная почечноклеточная карцинома, почки, поликистоз почек
156	AAELLKHPF	предстательная железа, аденокарцинома
157	GRVKLSDFGF	предстательная железа, аденокарцинома
158	KSNSIIVSPR	головной мозг, глиобластома, головной мозг, менингиома
159	ETLERLQEL	печень, гепатоклеточная карцинома, рак, околоушная слюнная железа, плеоморфная аденома
160	KDDELSRQ	печень, гепатоклеточная карцинома, рак, околоушная слюнная железа, плеоморфная аденома
161	LQQTNSEKI	почки, светлоклеточная почечноклеточная карцинома, околоушная слюнная железа, плеоморфная аденома
162	GEFGKPYFI	толстый кишечник или прямая кишка, семенник, семинома
163	KDVKVVIL	толстый кишечник или прямая кишка, семенник, семинома
164	RPVPPPSL	толстый кишечник или прямая кишка, семенник, семинома
165	KEDIPGRHSY	желудок, аденокарцинома, селезенка, хронический миелоидный лейкоз
166	KETKAVTNF	желудок, аденокарцинома, селезенка, хронический миелоидный лейкоз
167	YEILIHDL	желудок, аденокарцинома, селезенка, хронический миелоидный лейкоз
168	FPRFVNVTV	селезенка, хронический миелоидный лейкоз

169	QVAGWGSQR	селезенка, хронический миелоидный лейкоз
170	WIDGVLNNPGPG	селезенка, хронический миелоидный лейкоз
171	SFMTHPEF	желудок, аденокарцинома, миометрий, лейомиома
172	HYTIVFNTF	толстый кишечник или прямая кишка, миометрий, лейомиома
173	GTNDGPALKK	толстый кишечник или прямая кишка, печень, гепатоклеточная карцинома
174	IEDPVRPEV	толстый кишечник или прямая кишка, печень, гепатоклеточная карцинома
175	NTASGGMTR	головной мозг, глиобластома, кожа, плоскоклеточная карцинома
176	EVIETEKTLY	толстый кишечник или прямая кишка, молочная железа, муцинозная карцинома
177	MKILNHPNI	толстый кишечник или прямая кишка, легкие, плоскоклеточная карцинома
178	HEIDRYTAI	почки, светлоклеточная почечноклеточная карцинома, неходжкинская лимфома
179	VFTLKPLEF	почки, светлоклеточная почечноклеточная карцинома, неходжкинская лимфома
180	YWVPRNAL	почки, светлоклеточная почечноклеточная карцинома, неходжкинская лимфома
181	EVSPNLVRY	желудок, метастатический, поджелудочная железа, аденокарцинома
182	LSEIAGMTLP	желудок, метастатическая, поджелудочная железа, аденокарцинома
183	FLSFMNTEL	легкие, немелкоклеточная карцинома
184	KAVPSQKRT	легкие, желудок, аденокарцинома
185	LKAVPSQKRT	легкие, желудок, аденокарцинома
186	SLIAVFQKY	легкие, немелкоклеточная карцинома
187	IIKEKTVVY	легкие, желудок, аденокарцинома
188	LLEQKVWEV	печень, гепатоклеточная карцинома, рак, печень, гепатоклеточная карцинома
189	SEIAESHRF	печень, гепатоклеточная карцинома, рак, печень, гепатоклеточная карцинома
190	YLAIGIHEL	печень, гепатоклеточная карцинома, рак, печень, гепатоклеточная карцинома
191	IHDELQQSF	толстый кишечник или прямая кишка, селезенка, хронический миелоидный лейкоз
192	AHVIDKFL	почки, почечноклеточная карцинома
193	KAGGEFLRLY	почки, почечноклеточная карцинома
194	FEVKDLLSL	почки, светлоклеточная почечноклеточная карцинома, головной мозг, менингиома

195	FSKAKPSVL	печень, гепатоклеточная карцинома, молочная железа, инфильтрирующая лобулярная карцинома
196	EAIKALEV	желудок, метастатический рак, легкие, нейроэндокринная карцинома
197	EVASAKQSVKY	желудок, метастатический рак, легкие, нейроэндокринная карцинома
198	IEFTYTAKL	желудок, метастатический рак, легкие, нейроэндокринная карцинома
199	LLADITSKY	желудок, метастатический рак, легкие, нейроэндокринная карцинома
200	VLVDRTIYI	печень, гепатоклеточная карцинома, печень, фокальная нодулярная гиперплазия
201	IPVVHASI	желудок, аденокарцинома, толстая кишка, аденокарцинома
202	TVADQVLVGSY	желудок, аденокарцинома, толстая кишка, аденокарцинома
203	VALVHPDL	желудок, аденокарцинома, толстая кишка, аденокарцинома
204	LPDDKVTAL	желудок, метастатический рак, желудок, аденокарцинома
205	KIAKQIVQK	легкие, немелкоклеточная карцинома легких, легкие, нейроэндокринная аденокарцинома
206	VEKILLSVV	легкие, немелкоклеточная карцинома легких, легкие, нейроэндокринная аденокарцинома
207	APAGARGGPA	толстый кишечник или прямая кишка, прямой кишечник, аденокарцинома
208	EHLRKLEAE	толстый кишечник или прямая кишка, прямой кишечник, аденокарцинома
209	RFIPELINF	толстый кишечник или прямая кишка, прямой кишечник, аденокарцинома
210	TEKIAQLF	желудок, аденокарцинома, яичник, аденокарцинома
211	KLHDETLTY	желудок, аденокарцинома, яичник, аденокарцинома
212	LHDETLTYL	желудок, аденокарцинома, яичник, аденокарцинома
213	GPQEGNGPSLF	толстый кишечник или прямая кишка, синовиальная саркома
214	YLLQRAVEV	толстый кишечник или прямая кишка, синовиальная саркома
215	FAALHGPAL	плоскоклеточная карцинома
216	RMANLMGIEF	плоскоклеточная карцинома
217	DTFPGPYAVL	липосаркома
218	DTMPQTYKR	липосаркома
219	IEHVFVTDV	толстый кишечник или прямая кишка, лимфатический узел, инфильтрирующая протоковая карцинома молочной железы

220	KESPTSVGF	толстый кишечник или прямая кишка,
221	EAITAIMKY	лимфатический узел, инфильтрирующая протоковая карцинома молочной железы
222	KEKPAENTL	почки, светлоклеточная почечноклеточная карцинома, селезенка, неходжкинская лимфома
223	NEFQSQQNI	почки, светлоклеточная почечноклеточная карцинома, селезенка, неходжкинская лимфома
224	NVIDYGHASKY	почки, светлоклеточная почечноклеточная карцинома, селезенка, неходжкинская лимфома
225	FAKSQSKTF	атипичная липома
226	LPFSLAHL	атипичная липома
227	APNYRLKSL	желудок, аденокарцинома, легкие, метастатическая почечноклеточная карцинома
228	ILKDMGITEY	желудок, аденокарцинома, легкие, метастатическая почечноклеточная карцинома
229	AHDDGRWSL	желудок, метастатический рак, легкие, плоскоклеточная карцинома
230	KYLTAEAFGF	желудок, метастатический рак, легкие, плоскоклеточная карцинома
231	ESAALIHNY	печень, гепатоклеточная карцинома, фиброматоз
232	YQRETPQV	печень, гепатоклеточная карцинома, фиброматоз
233	EELQRNISL	почки, светлоклеточная почечноклеточная карцинома, яичник, аденокарцинома
234	RPAALFLTL	почки, светлоклеточная почечноклеточная карцинома, яичник, аденокарцинома
235	SEELQRNISL	почки, светлоклеточная почечноклеточная карцинома, яичник, аденокарцинома
236	ETIDSRVQEY	толстый кишечник или прямая кишка, яичник тератома
237	EVSEQILHM	желудок, метастатический рак, лимфатический узел, неходжкинская лимфома
238	GTLSSGILSSGK	желудок, аденокарцинома дифференцированного подтипа, шейка матки, плоскоклеточная карцинома
239	GVPIMLAY	головной мозг, глиобластома, шейка матки, плоскоклеточная карцинома
240	EEVKEEVKKF	легкие, немелкоклеточная карцинома легких, вилочковая железа, тимома
241	KTIAFLLLPMF	легкие, немелкоклеточная карцинома легких, вилочковая железа, тимома

242	EVTTNIPKM	печень, гепатоклеточная карцинома, рак, аденокистозная карцинома
243	IHGDTVQNQL	толстый кишечник или прямая кишка, надпочечная железа, карцинома коры надпочечников
244	RTMVKTLEY	толстый кишечник или прямая кишка, надпочечная железа, карцинома коры надпочечников
245	ETVRTLNPLY	головной мозг, глиобластома, сальник, лейомиосаркома, метастатическая
246	HSIDKVTSR	толстый кишечник или прямая кишка, паразитовидная железа, аденома
247	VSNPKSFEY	толстый кишечник или прямая кишка, паразитовидная железа, аденома
248	GLGPTFKL	легкие, немелкоклеточная карцинома легких, желудок, аденокарцинома
249	NKGISDIKV	легкие, немелкоклеточная карцинома легких, желудок, аденокарцинома
250	TSTTRPVL	легкие, немелкоклеточная карцинома легких, желудок, аденокарцинома
251	VLGGKAFLEHL	желудок, эндометрий, аденокарцинома
252	YEFERTTSI	желудок, эндометрий, аденокарцинома
253	YLDFTNPKV	печень, гепатоклеточная карцинома, шейка матки, плоскоклеточная карцинома
254	IPAVARTTTL	поджелудочная железа, аденокарцинома, миометрий, лейомиома
255	KQQLELDSI	поджелудочная железа, аденокарцинома, миометрий, лейомиома
256	KTTDTVSSF	поджелудочная железа, аденокарцинома, миометрий, лейомиома
257	DYLDGVHTVF	толстый кишечник или прямая кишка, фиброматоз
258	YLDGVHTVF	толстый кишечник или прямая кишка, фиброматоз
259	TYVSGMLRF	головной мозг, глиобластома, молочная железа, карцинома
260	DAIDGKQAR	головной мозг, глиобластома, печень, фокальная нодулярная гиперплазия
261	DPMAPGVQGSLL	легкие, немелкоклеточная карцинома легких, шейка матки, плоскоклеточная аденокарцинома
262	GLDPSQRPK	легкие, немелкоклеточная карцинома легких, шейка матки, плоскоклеточная аденокарцинома
263	IEDSRVYEL	желудок, метастатический, неходжкинская лимфома
264	YVHSFLSSGY	тонкий кишечник, гастроинтестинальная стромальная опухоль
265	HEYTTKEVF	печень, гепатоклеточная карцинома, рак, толстый кишечник, аденокарцинома

266	KLQEQLAQL	печень, гепатоклеточная карцинома, рак,
267	SIAAKILSY	толстый кишечник, аденокарцинома
268	KELLAVKL	печень, гепатоклеточная карцинома, рак,
269	KLKQTTSALEK	толстый кишечник, аденокарцинома
270	EVGPREGALR	поджелудочная железа, аденокарцинома,
271	SEAQEGQLQKF	легкие, аденокарцинома
272	DEAVLFVQV	поджелудочная железа, аденокарцинома,
273	EVAKFLSFY	яичник, муцинозная цистаденокарцинома
274	KLDQKLPEL	почки, светлоклеточная почечноклеточная
275	SVFEKSVGY	карцинома, почки, переходно-клеточная
276	NEGQTALHY	карцинома
277	VEFPSPEI	почки, светлоклеточная почечноклеточная
278	RLQGELQAV	карцинома, почки, переходно-клеточная
279	KELRELLSI	карцинома
280	SLVDQSAAL	поджелудочная железа, аденокарцинома,
281	LELIMSKY	яичник, муцинозная цистаденокарцинома
282	DIKPPIAEY	почки, светлоклеточная почечноклеточная
283	KLMAMFLEY	карцинома, почки, ангиомиолипома
284	YTVEKREGY	карцинома, почки, ангиомиолипома
285	FEFDIHQVI	почки, светлоклеточная почечноклеточная
286	SENPSKHDSF	карцинома, почки, ангиомиолипома
287	NFLRINTI	толстый кишечник или прямая кишка,
288	YSGPTSVSR	эндометрий, смешанная мюллерова
		опухоль
		толстый кишечник или прямая кишка,
		эндометрий, смешанная мюллерова
		опухоль
		почки, светлоклеточная почечноклеточная
		карцинома, почки, почечноклеточная
		карцинома
		толстый кишечник или прямая кишка,
		фиброматоз
		толстый кишечник или прямая кишка,
		фиброматоз
		толстый кишечник или прямая кишка,
		текома-фиброма
		поджелудочная железа, аденокарцинома,
		вилочковая железа, тимомы
		легкие, аденокарцинома,
		легкие, аденокарцинома,
		желудок, метастатический рак, молочная
		железа, карцинома
		желудок, метастатический рак, молочная
		железа, карцинома
		толстый кишечник или прямая кишка,
		желудок, аденокарцинома
		толстый кишечник или прямая кишка,
		желудок, аденокарцинома

289	DIYGGDYERF	толстый кишечник или прямая кишка, надпочечная железа, карцинома коры надпочечников
290	SARLEKLGY	желудок, метастатический рак, предстательная железа, доброкачественная нодулярная гиперплазия
291	YVFPGVTRL	желудок, метастатический рак, предстательная железа, доброкачественная нодулярная гиперплазия
292	YYLNEIQSF	желудок, метастатический рак, предстательная железа, доброкачественная нодулярная гиперплазия
293	YHSQDRYEF	желудок, метастатический, неходжкинская лимфома
294	FPPGRQVVM	головной мозг, рак, лимфатический узел, злокачественная меланома
295	ILDEAHERTI	головной мозг, рак, лимфатический узел, злокачественная меланома
296	VIYNEQMASK	печень, гепатоклеточная карцинома, рак, печень, фокальная нодулярная гиперплазия
297	EATSIKRVR	толстый кишечник или прямая кишка, аденокарцинома
298	LPEDKPRLI	толстый или прямой кишечник, аденокарцинома
299	KYPLNLYLL	почки, светлоклеточная почечноклеточная карцинома, липома
300	VHESPALILLF	почки, светлоклеточная почечноклеточная карцинома, липома
301	EVTGHSKGY	желудок, аденокарцинома, прямая кишка, аденокарцинома
302	RDSEELLQI	желудок, аденокарцинома, прямая кишка, аденокарцинома
303	SPASKTTL	желудок, аденокарцинома, прямая кишка, аденокарцинома
304	DAKTVNVI	толстый кишечник или прямая кишка, семенник, семинома
305	DSNATAAKM	толстый кишечник или прямая кишка, семенник, семинома
306	RTLNPQMLQK	толстый кишечник или прямая кишка, семенник, семинома
307	RTLNPQMLQKK	толстый кишечник или прямая кишка, семенник, семинома
308	LMAEMGVHSV	желудок, метастатический рак, молочная железа, карцинома
309	RLLPPVGTGR	желудок, метастатический рак, молочная железа, карцинома
310	VRIGTILIQTNQ	желудок, метастатический рак, молочная железа, карцинома
311	KELSVLSLI	желудок, метастатический рак, легкие, нейроэндокринная карцинома

312	TQPHPNTVY	желудок, метастатический рак, легкие, нейроэндокринная карцинома
313	ALEEQLLKY	желудок, аденокарцинома, злокачественная фиброзная гистиоцитома
314	DHFTGAIEKL	желудок, метастатический рак, молочная железа, карцинома
315	KILDLETEL	желудок, метастатический рак, молочная железа, карцинома
316	AEDIPSLKL	молочная железа, карцинома
317	DIPSLKLAL	молочная железа, карцинома
318	GLDPNKPPEL	молочная железа, карцинома
319	FLRDPAEAL	молочная железа, карцинома
320	GYGSQGYKY	молочная железа, карцинома
321	KLLAEVTLK	молочная железа, карцинома
322	SAADGPRVF	молочная железа, карцинома
323	KLYELHVFTF	толстый кишечник, аденома
324	YELHVFTF	толстый кишечник, аденома
325	YLNKEIEEA	толстый кишечник, аденома
326	DENEHQLSL	желудок, аденокарцинома, толстый кишечник, неходжкинская лимфома
327	EITPPVVLR	желудок, аденокарцинома, толстый кишечник, неходжкинская лимфома
328	GFEITPPVVLR	желудок, аденокарцинома, толстый кишечник, неходжкинская лимфома
329	HQLSLRTV	желудок, аденокарцинома, толстый кишечник, неходжкинская лимфома
330	MSVQPTVSL	желудок, аденокарцинома, лимфатический узел, неходжкинская лимфома
331	SIRDTPAKN	желудок, аденокарцинома, лимфатический узел, неходжкинская лимфома
332	SIRDTPAKNAQK	желудок, аденокарцинома, лимфатический узел, неходжкинская лимфома
333	SPIKVTLATL	желудок, аденокарцинома, лимфатический узел, неходжкинская лимфома
334	TPPVVLR	желудок, аденокарцинома, толстый кишечник, неходжкинская лимфома
335	VEAKFINY	желудок, аденокарцинома, толстый кишечник, неходжкинская лимфома
336	YEGSPIKV	желудок, аденокарцинома, толстый кишечник, неходжкинская лимфома
337	YEGSPIKVTL	желудок, аденокарцинома, толстый кишечник, неходжкинская лимфома
338	SELKMMTQL	лимфатический узел, неходжкинская лимфома
339	EKDPQPQQL	легкие, немелкоклеточная карцинома легких, шваннома
340	GYVPR TAL	легкие, немелкоклеточная карцинома легких, шваннома
341	KEKDPQPQQL	легкие, немелкоклеточная карцинома легких, шваннома

342	LPKKPSKLEL	легкие, немелкоклеточная карцинома легких, шваннома
343	RPSAASIDL	легкие, немелкоклеточная карцинома легких, шваннома
344	SRHPLSPGF	легкие, немелкоклеточная карцинома легких, шваннома
345	TPRSPQPEL	легкие, немелкоклеточная карцинома легких, шваннома
346	GRIVAFFEF	почки, светлоклеточная почечноклеточная карцинома, щитовидная железа, нодулярная гиперплазия
347	HTHPAASR	почки, светлоклеточная почечноклеточная карцинома, щитовидная железа, нодулярная гиперплазия
348	NPDELKTTV	легкие, немелкоклеточная карцинома легких, семенник, семинома
349	PSKQLPDQI	легкие, немелкоклеточная карцинома легких, семенник, семинома
350	VYVERAEVL	легкие, немелкоклеточная карцинома легких, семенник, семинома
351	DPFIIHSI	толстый кишечник или прямая кишка, шейка матки, плоскоклеточная карцинома
352	EHSIATLLL	толстый кишечник или прямая кишка, шейка матки, плоскоклеточная карцинома
353	FLDPRPLTV	поджелудочная железа, аденокарцинома, миометрий, лейомиома
354	SAFADRP AF	поджелудочная железа, аденокарцинома, миометрий, лейомиома
355	DTTLPASAR	желудок, аденокарцинома, прямая кишка, аденокарцинома
356	KLLEYIEEI	желудок, аденокарцинома, прямая кишка, аденокарцинома
357	LEKQLIEL	желудок, аденокарцинома, прямая кишка, аденокарцинома
358	LMSVYVVEL	печень, гепатоклеточная карцинома, рак
359	ESITDVLVR	поджелудочная железа, аденокарцинома, желудок, аденокарцинома
360	ETAFQGMLR	поджелудочная железа, аденокарцинома, желудок, аденокарцинома,
361	EVPDVTATPARL	поджелудочная железа, аденокарцинома, желудок, аденокарцинома,
362	GRIVTLISF	поджелудочная железа, аденокарцинома, желудок, аденокарцинома,
363	HVFSDGVTNW	поджелудочная железа, аденокарцинома, желудок, аденокарцинома,
364	REIGGGEAGAVI	поджелудочная железа, аденокарцинома, желудок, аденокарцинома,
365	RGWDGFVEF	поджелудочная железа, аденокарцинома, желудок, аденокарцинома,
366	RPAVLPLL	поджелудочная железа, аденокарцинома, желудок, аденокарцинома,

394	RSDMLKDII	лимфатический узел, карцинома молочной железы
395	SESGAGLTRF	лимфатический узел, карцинома молочной железы
396	SMMQTLLTV	лимфатический узел, карцинома молочной железы
397	TEVSKTPEA	лимфатический узел, карцинома молочной железы
398	VEVPETPKA	лимфатический узел, карцинома молочной железы
399	DVYPEIIEP	головной мозг, глиобластома, лимфатический узел, карцинома молочной железы
400	REVEIQSHL	желудок, аденокарцинома, желудок, аденокарцинома
401	EPPAVLLL	легкие, немелкоклеточная карцинома
402	LEADPFLKY	легких, сальник, аденокарцинома
403	TTQGQDVTLA	легких, сальник, аденокарцинома
404	AEYEDGFSIP	желудок, аденокарцинома, легкие, аденокарцинома
405	AQISLPRI	поджелудочная железа, аденокарцинома, кости, остеосаркома
406	DFTPEPAAR	селезенка, хронический миелоидный лейкоз
407	DNTGITTVSK	селезенка, хронический миелоидный лейкоз
408	EEAKQLVDKAY	селезенка, хронический миелоидный лейкоз
409	ERRESIKQ	селезенка, хронический миелоидный лейкоз
410	ETVGQLGTVLR	селезенка, хронический миелоидный лейкоз
411	FEQVMRIGL	селезенка, хронический миелоидный лейкоз
412	FSMQQRQAL	селезенка, хронический миелоидный лейкоз
413	GVPFFSSLR	селезенка, хронический миелоидный лейкоз
414	IVRFPTDQL	селезенка, хронический миелоидный лейкоз
415	KQPVAATR TAV	селезенка, хронический миелоидный лейкоз
416	LGASNRAFV	селезенка, хронический миелоидный лейкоз
417	NPRWDGERL	селезенка, хронический миелоидный лейкоз
418	NVFTNAFRY	селезенка, хронический миелоидный лейкоз

419	QPMENPRVPL	селезенка, хронический миелоидный лейкоз
420	QPVAATRTAV	селезенка, хронический миелоидный лейкоз
421	RLFQVMRI	селезенка, хронический миелоидный лейкоз
422	SEEPLARNL	селезенка, хронический миелоидный лейкоз
423	TIRNQINAL	селезенка, хронический миелоидный лейкоз
424	VLGPTAMRK	селезенка, хронический миелоидный лейкоз
425	AELRNATAA	поджелудочная железа, аденокарцинома, молочная железа, карцинома
426	DVPDGTLVTVM	поджелудочная железа, аденокарцинома, молочная железа, карцинома
427	LPIAFKVV	поджелудочная железа, аденокарцинома, молочная железа, карцинома
428	SAMGSATRY	поджелудочная железа, аденокарцинома, молочная железа, карцинома
429	AEKQGHQW	желудок, метастатический рак, яичник, гранулезоклеточная опухоль
430	GEQKPTGTF	желудок, метастатический рак, яичник, гранулезоклеточная опухоль
431	GQFSKPFSF	желудок, метастатический рак, яичник, гранулезоклеточная опухоль
432	IAFFDVRTF	желудок, метастатический рак, яичник, гранулезоклеточная опухоль
433	LSAGKTSFSF	желудок, метастатический рак, яичник, гранулезоклеточная опухоль
434	VSNKYGLVF	желудок, метастатический рак, яичник, гранулезоклеточная опухоль
435	GEVDVEQHTL	толстый кишечник или прямая кишка, толстый кишечник, аденокарцинома
436	VDVEQHTL	толстый кишечник или прямая кишка, толстый кишечник, аденокарцинома
437	DAADELSVGRY	почки, светлоклеточная почечноклеточная карцинома, толстый кишечник, аденома
438	LSEADVRA	желудок, аденокарцинома, легкие, аденокарцинома
439	ELTLGEFLK	желудок, метастатический рак, яичник, смешанная мюллерова опухоль
440	ELTLGEFLKL	желудок, метастатический рак, яичник, смешанная мюллерова опухоль
441	LTLGEFLK	желудок, метастатический рак, яичник, смешанная мюллерова опухоль
442	LTLGEFLKL	желудок, метастатический рак, яичник, смешанная мюллерова опухоль
443	TLGEFLKL	желудок, метастатический рак, яичник, смешанная мюллерова опухоль

444	KTYTKSSHLK	желудок, аденокарцинома, головной мозг, менингиома
445	SQLTTLSFY	легкие, немелкоклеточная карцинома
446	KMQEKKKLQ	легких, сальник, аденокарцинома
447	LLGHLPAEI	печень, гепатоклеточная карцинома, легкие, крупноклеточная карцинома
448	APVELILSDETLPAPE	печень, гепатоклеточная карцинома, рак
449	ETPDFQLFKNGVAQEPV	печень, гепатоклеточная карцинома, рак
450	LAPLEGARFALVRED	печень, гепатоклеточная карцинома, рак
451	SPDRIFHLNAVALGD	печень, гепатоклеточная карцинома, рак
452	SPDRIFHLNAVALGDG	печень, гепатоклеточная карцинома, рак
453	EEMRKLQATVQELQKR	лимфатический узел, неходжкинская лимфома
454	EEPLSLQELDTSSG	лимфатический узел, неходжкинская лимфома
455	EMRKLQATVQELQKR	лимфатический узел, неходжкинская лимфома
456	HLEEPLSLQELDTSSG	лимфатический узел, неходжкинская лимфома
457	LEEPLSLQELDTSSG	лимфатический узел, неходжкинская лимфома
462	GVVHSFSHNVGPGDK	печень, гепатоклеточная карцинома, рак, легкие, аденокарцинома
463	GVVHSFSHNVGPGDKY	печень, гепатоклеточная карцинома, рак, легкие, аденокарцинома
464	GVVHSFSHNVGPGDKYT	печень, гепатоклеточная карцинома, рак, легкие, аденокарцинома
465	KTEEFEVTKTAVAHRP	печень, гепатоклеточная карцинома, рак, легкие, аденокарцинома
466	KTEEFEVTKTAVAHRPG	печень, гепатоклеточная карцинома, рак, легкие, аденокарцинома
467	VRPGGVVHSFSHNVGPGDK	печень, гепатоклеточная карцинома, рак, легкие, аденокарцинома
468	VRPGGVVHSFSHNVGPGDKYT	печень, гепатоклеточная карцинома, рак, легкие, аденокарцинома
469	AEKGVRTLTAAGVSGAQ	поджелудочная железа, аденокарцинома, кости, гигантоклеточная опухоль кости
470	AQPILSKLEPQIASASE	поджелудочная железа, аденокарцинома, кости, гигантоклеточная опухоль кости
471	EKGVRTLTAAGVSGAQ	поджелудочная железа, аденокарцинома, кости, гигантоклеточная опухоль кости
472	EKGVRTLTAAGVSGAQP	поджелудочная железа, аденокарцинома, кости, гигантоклеточная опухоль кости
473	GVRTLTAAGVSGAQ	поджелудочная железа, аденокарцинома, кости, гигантоклеточная опухоль кости
474	KGVRTLTAAAGVSGAQ	поджелудочная железа, аденокарцинома, кости, гигантоклеточная опухоль кости
475	DVNEYAPVFKEKSYK	головной мозг, глиобластома, околоушная слюнная железа, плеоморфная аденома

476	HRSFVDLSGHNLA	головной мозг, глиобластома, околоушная слюнная железа, плеоморфная аденома
477	HRSFVDLSGHNLANPH	головной мозг, глиобластома, околоушная слюнная железа, плеоморфная аденома
478	HRSFVDLSGHNLANPHP	головной мозг, глиобластома, околоушная слюнная железа, плеоморфная аденома
479	ALPEFDGKRFQNVAK	печень, гепатоклеточная карцинома, рак, щитовидная железа, нодулярная гиперплазия
480	DSNEFSVIADPRG	печень, гепатоклеточная карцинома, рак, щитовидная железа, нодулярная гиперплазия
481	DSNEFSVIADPRGN	печень, гепатоклеточная карцинома, рак, щитовидная железа, нодулярная гиперплазия
482	DSNEFSVIADPRGNT	печень, гепатоклеточная карцинома, рак, щитовидная железа, нодулярная гиперплазия
483	DSNEFSVIADPRGNTL	печень, гепатоклеточная карцинома, рак, щитовидная железа, нодулярная гиперплазия
484	DSNEFSVIADPRGNTLG	печень, гепатоклеточная карцинома, рак, щитовидная железа, нодулярная гиперплазия
485	PEFDGKRFQNVAK	печень, гепатоклеточная карцинома, рак, щитовидная железа, нодулярная гиперплазия
486	SDSNEFSVIADPRGNTLG	печень, гепатоклеточная карцинома, рак, щитовидная железа, нодулярная гиперплазия
487	SQKKTFEINPRHPLIR	печень, гепатоклеточная карцинома, рак, щитовидная железа, нодулярная гиперплазия
488	ALPEFDGKRFQNVAK	печень, гепатоклеточная карцинома, рак, щитовидная железа, нодулярная гиперплазия
489	PEFDGKRFQNVAK	печень, гепатоклеточная карцинома, рак, щитовидная железа, нодулярная гиперплазия
490	PEFDGKRFQNVAKE	печень, гепатоклеточная карцинома, рак, щитовидная железа, нодулярная гиперплазия
491	LNSLTYQVLDVQRYYP	почки, светлоклеточная почечноклеточная карцинома, эндометрий, аденокарцинома
492	LPQLVGVSTPLQG	почки, светлоклеточная почечноклеточная карцинома, эндометрий, аденокарцинома
493	LPQLVGVSTPLQGG	почки, светлоклеточная почечноклеточная карцинома, эндометрий, аденокарцинома
494	LPQLVGVSTPLQGGGS	почки, светлоклеточная почечноклеточная карцинома, эндометрий, аденокарцинома

495	RLPQLVGVSTPLQGGG	почки, светлоклеточная почечноклеточная карцинома, эндометрий, аденокарцинома
496	SDVDLIPMNDHNAYR	почки, светлоклеточная почечноклеточная карцинома, эндометрий, аденокарцинома
497	GRRKSRQGSLAMEELK	прямая кишка, аденокарцинома
498	RKSRQGSLAMEELK	прямая кишка, аденокарцинома
499	SGPSLKGEELPLVASEDGAVD	прямая кишка, аденокарцинома
500	SGSGPSLKGEELPLVASEDGAVD	прямая кишка, аденокарцинома
501	IKPGVTTEEIDHAVH	эндометрий, аденокарцинома,
502	KPGVTTEEIDHAVH	эндометрий, аденокарцинома,
503	DGVLRIQNLDQS	поджелудочная железа, аденокарцинома, миометрий, лейомиома
504	GAYFHDDGFLAFPG	поджелудочная железа, аденокарцинома, миометрий, лейомиома
505	TPYSFLPLPTIKDAYR	поджелудочная железа, аденокарцинома, миометрий, лейомиома
506	YPTPDISWSKLDGSLPP	поджелудочная железа, аденокарцинома, миометрий, лейомиома
507	YPTPDISWSKLDGSLPPD	поджелудочная железа, аденокарцинома, миометрий, лейомиома
508	ASHFEQMAAASMHR	метастатическая почечноклеточная карцинома
509	GGQVIVAIPKLQTQQ	паращитовидная железа, аденома
510	GQVIVAIPKLQTQ	паращитовидная железа, аденома
511	GQVIVAIPKLQTQQ	паращитовидная железа, аденома
512	IESTFDVVSSKPVG	паращитовидная железа, аденома
513	DWGALATISTLEAVRG	легкие, немелкоклеточная карцинома легких, печень, гепатоклеточная карцинома
514	GRPFADVLSLSDGPPG	легкие, немелкоклеточная карцинома легких, печень, гепатоклеточная карцинома
515	WGALATISTLEAVR	легкие, немелкоклеточная карцинома легких, печень, гепатоклеточная карцинома
516	WGALATISTLEAVRG	легкие, немелкоклеточная карцинома легких, печень, гепатоклеточная карцинома
517	ADELALVDVIEDK	почки, светлоклеточная гепатоклеточная карцинома, почки, почечноклеточная карцинома
518	GVSLKTLHPDLGTDK	почки, светлоклеточная гепатоклеточная карцинома, почки, почечноклеточная карцинома
519	IVSGKDYNVTANSKL	почки, светлоклеточная гепатоклеточная карцинома, почки, почечноклеточная карцинома
520	DDNIKTYSDHPEK	почки, светлоклеточная гепатоклеточная карцинома, печень, почечноклеточная карцинома

521	DKVYVHLKNLASRPY	почки, светлоклеточная гепатоклеточная карцинома, печень, почечноклеточная карцинома
522	GDKVYVHLKNLASRPY	почки, светлоклеточная гепатоклеточная карцинома, печень, почечноклеточная карцинома
523	LDDNIKTYSDHPEK	почки, светлоклеточная гепатоклеточная карцинома, печень, почечноклеточная карцинома
524	TGDKVYVHLKNLASRPY	почки, светлоклеточная гепатоклеточная карцинома, печень, почечноклеточная карцинома
525	VYVHLKNLASRPY	почки, светлоклеточная гепатоклеточная карцинома, печень, почечноклеточная карцинома
526	KTSRLPIIDVAPLDVGAPD	поджелудочная железа, аденокарцинома, хондросаркома
527	KTSRLPIIDVAPLDVGAPDQE	поджелудочная железа, аденокарцинома, хондросаркома
528	LPIIDVAPLDVGAPD	поджелудочная железа, аденокарцинома, хондросаркома
529	RLPIIDVAPLDVGAPD	поджелудочная железа, аденокарцинома, хондросаркома
530	RLPIIDVAPLDVGAPDQE	поджелудочная железа, аденокарцинома, хондросаркома
531	SRLPIIDVAPLDVGAPD	поджелудочная железа, аденокарцинома, хондросаркома
532	SRLPIIDVAPLDVGAPDQE	поджелудочная железа, аденокарцинома, хондросаркома
533	TSRLPIIDVAPLDVGAPD	поджелудочная железа, аденокарцинома, хондросаркома
534	TSRLPIIDVAPLDVGAPDQE	поджелудочная железа, аденокарцинома, хондросаркома
535	DTSYVSLKAPLT	печень, гепатоклеточная карцинома, рак
536	DTSYVSLKAPLTKP	печень, гепатоклеточная карцинома, рак
537	DTSYVSLKAPLTKPL	печень, гепатоклеточная карцинома, рак
538	ESDTSYVSLKAPLT	печень, гепатоклеточная карцинома, рак
539	ESDTSYVSLKAPLTKPL	печень, гепатоклеточная карцинома, рак
540	SDTSYVSLKAPLT	печень, гепатоклеточная карцинома, рак
541	SDTSYVSLKAPLTKP	печень, гепатоклеточная карцинома, рак
542	SDTSYVSLKAPLTKPL	печень, гепатоклеточная карцинома, рак
543	DPASFRAAIGLLARH	почки, светлоклеточная гепатоклеточная карцинома, прямая кишка, аденокарцинома
544	TEGQFVDLTGNRLTYT	печень, гепатоклеточная карцинома, рак, печень, фокальная нодулярная гиперплазия
545	ALDFFGNGPPVNYK	легкие, немелкоклеточная карцинома легких
546	ALDFFGNGPPVNYKTG	легкие, немелкоклеточная карцинома легких, кости, неоссифицирующая фиброма

547	DDFGNGPPVNYKTG	легкие, немелкоклеточная карцинома легких, кости, неоссифицирующая фиброма
548	LDDFGNGPPVNYK	легкие, немелкоклеточная карцинома легких, кости, неоссифицирующая фиброма
549	LDDFGNGPPVNYKTG	легкие, немелкоклеточная карцинома легких, кости, неоссифицирующая фиброма
550	QALDDFGNGPPVNYKTG	легкие, немелкоклеточная карцинома легких, кости, неоссифицирующая фиброма
551	AISDYVFNTASLVYH	печень, гепатоклеточная карцинома, рак
552	AISDYVFNTASLVYHEE	печень, гепатоклеточная карцинома, рак
553	ISDYVFNTASLVYH	печень, гепатоклеточная карцинома, рак
554	ISDYVFNTASLVYHEE	печень, гепатоклеточная карцинома, рак
555	YVFNTASLVYHEE	печень, гепатоклеточная карцинома, рак
556	IVIALSGNKADLA	головной мозг, глиобластома, эндометрий, аденокарцинома
557	SPNIVIALSGNKADL	головной мозг, глиобластома, эндометрий, аденокарцинома
558	SPNIVIALSGNKADLA	головной мозг, глиобластома, эндометрий, аденокарцинома
559	TPPRLVAPRFLEVE	желудок, метастатический рак, неходжкинская лимфома
560	TPPRLVAPRFLEVET	желудок, метастатический рак, неходжкинская лимфома
561	TPPRLVAPRFLEVETS	желудок, метастатический рак, неходжкинская лимфома
562	EIQRDILLEKKKVAQDQ	желудок, метастатический рак, печень, аденома печени
563	FGAIFFLPDSSK	желудок, метастатический рак, печень, аденома печени
564	IQRDILLEKKKVAQ	желудок, метастатический рак, печень, аденома печени
565	IQRDILLEKKKVAQD	желудок, метастатический рак, печень, аденома печени
566	IQRDILLEKKKVAQDQ	желудок, метастатический рак, печень, аденома печени
567	LSGVLFHSSPALQPA	желудок, метастатический рак, печень, аденома печени
568	RDILLEKKKVAQDQ	желудок, метастатический рак, печень, аденома печени
569	SSKLLSGVLFHSSPA	желудок, метастатический рак, печень, аденома печени
570	SSPALQPAADHKPGPG	желудок, метастатический рак, печень, аденома печени
571	APPTRGPPPSYGG	толстый кишечник или прямая кишка, вилочковая железа, тимомы,
572	GNSRSAPPTRGPPPSYGGSSRY	толстый кишечник или прямая кишка, вилочковая железа, тимомы,

573	RDYGHSSSRDDYPS	толстый кишечник или прямая кишка, вилочковая железа, тимомы,
574	SPRDDGYSTKDSY	толстый кишечник или прямая кишка, вилочковая железа, тимомы
575	GGSAAAAAAAAAASGG	печень, гепатоклеточная карцинома, миометрий, лейомиома
576	DNMLLAEGVSGPEK	печень, гепатоклеточная карцинома, надпочечная железа, карцинома коры надпочечников
577	ADSLYVEKIDVGAEPR	пищевод, аденокарцинома
578	RIQLVEEELDRAQER	поджелудочная железа, аденокарцинома, интрамуральная липома
579	RRIQLVEEELDRAQER	поджелудочная железа, аденокарцинома, интрамуральная липома
580	HQPHKVTQYKKGKDSLY	липосаркома
581	RKKAKTTKKIVL	липосаркома
582	DVFRQYASLTGTQALPP	печень, гепатоклеточная карцинома, рак, тонкий кишечник, гастроинтестинальная стромальная опухоль
583	GTAQGELFLDDGHT	печень, гепатоклеточная карцинома, рак, тонкий кишечник, гастроинтестинальная стромальная опухоль
584	VFRQYASLTGTQALPP	печень, гепатоклеточная карцинома, рак, тонкий кишечник, гастроинтестинальная стромальная опухоль
585	PEFDGKRFQNVAK	печень, гепатоклеточная карцинома, рак, щитовидная железа, нодулярная гиперплазия
586	PEFDGKRFQNVAKE	печень, гепатоклеточная карцинома, рак, щитовидная железа, нодулярная гиперплазия
587	ALPEFDGKRFQNVAKEG	печень, гепатоклеточная карцинома, рак, щитовидная железа, нодулярная гиперплазия
588	ASPSESEARFRIDSVSEGNAGPY	поджелудочная железа, аденокарцинома, липома
589	EARFRIDSVSEGNAGP	поджелудочная железа, аденокарцинома, липома
590	ESEARFRIDSVSEGNAGP	поджелудочная железа, аденокарцинома, липома
591	ESEARFRIDSVSEGNAGPY	поджелудочная железа, аденокарцинома, липома
592	FRIDSVSEGNAGP	поджелудочная железа, аденокарцинома, липома
593	FRIDSVSEGNAGPY	поджелудочная железа, аденокарцинома, липома
594	SEARFRIDSVSEGNAGPY	поджелудочная железа, аденокарцинома, липома
595	SPSESEARFRIDSVSEGNAGPY	поджелудочная железа, аденокарцинома, липома

596	GNQLFRINEANQL	желудок, аденокарцинома, предстательная железа, аденокарцинома
597	GNQLFRINEANQLMQ	желудок, аденокарцинома, предстательная железа, аденокарцинома
598	SPAMAGGLFAIERE	желудок, аденокарцинома, предстательная железа, аденокарцинома
599	FIGNIAVNHAPVSPR	желудок, аденокарцинома, метастатическая карцинома молочной железы
600	FIGNIAVNHAPVSPRPG	желудок, аденокарцинома, метастатическая карцинома молочной железы
601	IGNIAVNHAPVSPRP	желудок, аденокарцинома, метастатическая карцинома молочной железы
602	IGNIAVNHAPVSPRPG	желудок, аденокарцинома, метастатическая карцинома молочной железы
603	FEGQFSINKVPGNFH	почки, светлоклеточная почечноклеточная карцинома, предстательная железа, аденокарцинома
604	FEGQFSINKVPGNFHVS	почки, светлоклеточная почечноклеточная карцинома, предстательная железа, аденокарцинома
605	RFEGQFSINKVPGNFH	почки, светлоклеточная почечноклеточная карцинома, предстательная железа, аденокарцинома

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению пептидов по настоящим изобретением для - предпочтительно комбинированного - лечения пролиферативного заболевания, выбранного из группы атипичная липома;

рак головного мозга и пролиферативное заболевание, выбранное из: онкоцитомы почки и злокачественная меланома лимфатического узла; глиобластома; и пролиферативное заболевание, выбранное из: неоссифицирующая фиброма кости, менингиома, карцинома молочной железы, эндометрическая аденокарцинома, лейомиосаркома сальника, плеоморфная аденома околоушной слюнной железы, плоскоклеточная карцинома кожи, нодулярная гиперплазия щитовидной железы и плоскоклеточная карцинома шейки матки;

лобулярная карцинома молочной железы;

интрадуктальная карцинома молочной железы;

рак толстой или прямой кишки и пролиферативное заболевание, выбранное из: аденокарцинома, карцинома коры надпочечников, муцинозная карцинома молочной

железы, аденокарцинома, смешанная мюллерова опухоль эндометрия, фиброматоз, карцинома почки, фокальная нодулярная гиперплазия печени, гепатоклеточная карцинома печени, мелкоклеточная карцинома легкого, плоскоклеточная карцинома легкого, карцинома молочной железы, неходжкинская лимфома узла с поражением лимфатических узлов, метастатическая почечноклеточная карцинома, лейомиома миометрия, тератома яичника, текома-фиброма яичника, аденома паращитовидной железы, доброкачественная нодулярная гиперплазия предстательной железы, аденокарцинома прямой кишки, хронический миелоидный лейкоз селезенки, экстрамедуллярный гемопоэз селезенки, аденокарцинома желудка, синовиальная саркома, семинома семенника, тимома вилочковой железы и плоскоклеточная карцинома шейки матки;

аденома толстой кишки,

аденокарцинома эндометрия,

пищевод, аденокарцинома;

ангиомиолипома почки;

светлоклеточная почечноклеточная карцинома почки и пролиферативное заболевание, выбранное из: неоссифицирующая фиброма, менингиома головного мозга, аденокарцинома толстой кишки, аденома толстой кишки, неходжкинская лимфома толстой кишки;

светлоклеточная почечноклеточная карцинома почки и пролиферативное заболевание, выбранное из: аденокарцинома эндометрия, ангиомиолипома почки, поликистозная болезнь почек, переходноклеточная карцинома почки, липома, неходжкинская лимфома, аденокарцинома яичника, плеоморфная аденома околоушной слюнной железы, аденокарцинома предстательной железы, неходжкинская лимфома селезенки, гастроинтестинальная стромальная опухоль (ГИСО) желудка, синовиальная саркома и нодулярная гиперплазия щитовидной железы;

почки, почечноклеточная карцинома; например, несветлоклеточного типа;

липосаркома;

фокальная нодулярная гиперплазия печени;

печень, гепатоклеточная карцинома и пролиферативное заболевание, выбранное из: аденома коры надпочечников, карцинома молочной железы, аденокистозная карцинома, аденокарцинома толстой кишки, фокальная нодулярная гиперплазия печени, гепатоклеточная карцинома печени, аденокарцинома легких, аденокарцинома поджелудочной железы, плеоморфная аденома околоушной слюнной железы,

гастроинтестинальная стромальная опухоль тонкой кишки, нодулярная гиперплазия щитовидной железы, фиброматоз, ангиомиолипома почки, почечноклеточная карцинома почки, фокальная нодулярная гиперплазия печени, крупноклеточная карцинома легких, лейомиома миометрия и плоскоклеточная карцинома шейки матки; аденокарцинома легких;

немелкоклеточная карцинома легких и пролиферативное заболевание, выбранное из: неоссифицирующая фиброма, карцинома почки, гепатоклеточная карцинома печени, аденокарцинома легких, нейроэндокринная карцинома легких, сальник, аденокарцинома, шваннома, хронический миелоидный лейкоз селезенки, экстрамедуллярный гемопоэз селезенки, аденокарцинома желудка, семинома семенника, тимома вилочковой железы и плоскоклеточная карцинома шейки матки;

инфильтрирующая карцинома молочной железы, поражающая лимфатические узлы;

неходжкинская лимфома с поражением лимфатических узлов;

злокачественная фиброзная гистиоцитома;

метастатическая, инфильтрирующая карцинома молочной железы;

метастатическая почечноклеточная карцинома;

аденокарцинома сальника;

аденокарцинома яичника светлоклеточного типа;

гранулезоклеточная опухоль яичника;

аденокарцинома поджелудочной железы и пролиферативное заболевание, выбранное из: гигантоклеточная опухоль кости, остеосаркома кости, карцинома молочной железы, хондросаркома, интрамуральная липома, липома, аденокарцинома легких, лимфома Ходжкина с поражением лимфатических узлов, миометрий, лейомиома, муцинозная цистаденокарцинома яичника, аденокарцинома желудка и тимома вилочковой железы;

аденома паращитовидной железы;

аденокарцинома предстательной железы;

аденокарцинома прямой кишки;

гастроинтестинальная стромальная опухоль тонкой кишки;

хронический миелоидный лейкоз селезенки;

экстрамедуллярный гемопоэз селезенки;

плоскоклеточная карцинома;

аденокарцинома желудка и пролиферативное заболевание, выбранное из: менингиома головного мозга, карциноидная метастатическая опухоль печени, аденокарцинома предстательной железы и хронический миелоидный лейкоз селезенки;

аденокарцинома желудка дифференцированного подтипа и пролиферативное заболевание, выбранное из: аденокарцинома толстой кишки, неходжкинская лимфома толстой кишки, аденокарцинома эндометрия, опухоль Вильмса почки, аденокарцинома легких, мелкоклеточная карцинома легких, неходжкинская лимфома с поражением лимфатических узлов, злокачественная фиброзная гистиоцитома, метастатическая, инфильтрирующая лобулярная карцинома молочной железы, аденома паращитовидной железы, аденокарцинома прямой кишки, аденокарцинома желудка, семинома семенника и плоскоклеточная карцинома шейки матки;

аденокарцинома желудка и пролиферативное заболевание, выбранное из: аденокарцинома легких, метастатическая почечноклеточная карцинома, лейомиома миометрия, неходжкинская лимфома, фунгоидный микоз, аденокарцинома яичника, аденокарцинома поджелудочной железы и хронический лимфоцитарный лейкоз с повышением уровня лейкоцитов;

аденокарцинома эндометрия, желудка;

метастатический рак желудка и пролиферативное заболевание, выбранное из: аденокарцинома, неоссифицирующая фиброма кости, карцинома молочной железы, аденокарцинома двенадцатиперстной кишки, аденома печени, крупноклеточная карцинома легких, нейроэндокринная карцинома легких, плоскоклеточная карцинома легких, неходжкинская лимфома с поражением лимфатических узлов, гранулезоклеточная опухоль яичника, смешанная мюллерова опухоль яичника, аденокарцинома поджелудочной железы, доброкачественная нодулярная гиперплазия предстательной железы и базальноклеточная карцинома;

нодулярная гиперплазия щитовидной железы;

и плоскоклеточная карцинома шейки матки.

ACBD6 кодирует модулярный белок, имеющий ацил-КоА-связывающий домен на своем N-конце и два анкириновых мотива на С-конце. Экспрессия ACBD6 ограничена тканями и клетками-предшественниками, он участвует в формировании клеток крови и развитии кровеносных сосудов. ACBD6 был обнаружен в костном мозге, селезенке, плаценте, пуповинной крови, циркулирующих клетках-предшественниках CD34+ и стволовых клетках, похожих на эмбриональные, полученных из плаценты (Soupene et al., 2008).

BRAP кодирует BRCA1-ассоциированный белок, который был идентифицирован по его способности связываться с клеточным сигналом внутриядерной локализации BRCA1 и

другими белками. Это цитоплазматический белок, который, возможно, регулирует транспорт в ядро клетки посредством сохранения белков с сигналом внутриядерной локализации в цитоплазме (RefSeq, 2002). BRAP описывали в качестве лейкоз-ассоциированного антигена (Greiner et al., 2003).

CDCA7L кодирует белок, подобный белку 7, ассоциированному с циклом деления клеток, который взаимодействует с онкогеном c-Myc и усиливает его трансформационную активность (Huang et al., 2005). Уровень CDCA7L сильно повышен при гепатоклеточной карциноме и эктопическая избыточная экспрессия CDCA7L способствует пролиферации клеток гепатоклеточной карциномы и образованию колоний (Tian et al., 2013).

CHTF18 кодирует белок, который вместе с CHTF8 и DCC1 является компонентом альтернативного комплекса фактора репликации C, который нагружает ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA) на ДНК во время фазы S клеточного цикла (RefSeq, 2002). CHTF18 вместе с другими генами комплекса фактора репликации C могут индуцировать взаимодействия между генами, вызывающими синтетическую летальность, что тормозит пролиферацию соматических клеток у нематоды *Caenorhabditis elegans*. В связи с этим фактом CHTF18 был идентифицирован в качестве кандидата для нацеливания противораковых лекарственных препаратов (McLellan et al., 2009). Совместное возникновение соматических мутаций в ESCO1 и CHTF18 было статистически значимым в неэндометриоидных формах опухолей эндометрия (Price et al., 2014).

KIF15 кодирует члена семейства кинезинов 15, белок, задействованный в сборке и стабилизации митотического веретена (Vanneste et al., 2009). Как было показано, KIF15 избыточно экспрессируется и является иммуногенным в раковой ткани молочной железы, так как из крови пациентов с раком молочной железы можно выделить антитела к KIF15 (Scanlan et al., 2001). Кроме того, KIF15, видимо, причастен к развитию аденокарциномы легких (Bidkhorj et al., 2013).

NOP14 кодирует белок, который играет роль в процессинге пре-rРНК 18s и сборке малой рибосомной субъединицы (RefSeq, 2002). Мутации внутри гена NOP14 и аномальная экспрессия были обнаружены при раке поджелудочной железы. В раковых клетках

поджелудочной железы избыточная экспрессия NOP14 способствует миграции, пролиферации и образованию колоний (Zhou et al., 2012b; Zhou et al., 2012a). Пониженный уровень экспрессии NOP14 в образцах цельной крови пациентов с раком яичника коррелировал с неблагоприятным прогнозом (Isaksson et al., 2014).

NUDCD1 кодирует белок 1, содержащий домен NudC, известный также как антиген 66, ассоциированный с раком яичника (OVA66) (RefSeq, 2002). В раковых клетках человека NUDCD1 влияет на онкогенез за счет регуляции сигнального пути рецептора инсулиноподобного фактора роста типа I (IGF-1R) (Rao et al., 2014a). NUDCD1 индуцирует онкогенную трансформацию NIH3T3, клеточной линии эмбриональных фибробластов мыши (Rao et al., 2014b).

PRIM1 кодирует белок, который является малой субъединицей примазы в 49 кДа. Примаза и ДНК-полимераза альфа – это два ключевых ферментных компонента для репликации ДНК в эукариотических клетках (RefSeq, 2002). Как было установлено, PRIM1 был амплифицирован в 41% 22 образцов ткани остеосаркомы у детей. PRIM1 совместно амплифицирован с центральными генами ампликона 12q13 CDK4, SAS и OS9 и был физически картирован очень близко к ним (Yotov et al., 1999). Повышенный уровень экспрессии SIX1 при раке шейки матки приводит к повышенной регуляции многочисленных генов, связанных с инициацией репликации ДНК, включая PRIM1 (Liu et al., 2014).

QTRTD1 кодирует субъединицу тРНК-гуанин-трансглицозилазы, которая играет важнейшую роль в модификации тРНК за счет синтеза 7-деазагуанозин-квеуозина. Закодированный белок может играть роль в «реутилизационном пути» квеуозин-5'-монофосфата (RefSeq, 2002).

SDAD1 кодирует слабо охарактеризованный белок, который может быть задействован в процессинге рРНК. Как было показано, однонуклеотидные полиморфизмы внутри гена SDAD1 ассоциировались с сезонным аллергическим ринитом (Babbio et al., 2004; Zhang et al., 2005).

TARBP1 кодирует РНК TAR (ВИЧ-1)-связывающий белок 1, связывающийся с двухнитевой РНК, который, возможно, отделяет РНК-полимеразу II от TAR ВИЧ-1 во

время транскрипционной элонгации (RefSeq, 2002). Было показано, что экспрессия TARBP1 значительно повышена в клетках базальноклеточной карциномы и плоскоклеточной карциномы кожи (Sand et al., 2012).

VCPIP1 (также известный как VCIP135) и p47, как было показано, задействованы в комплексе Гольджи и сборке ЭР (Uchiyama et al., 2002). Уровень VCPIP1 понижен при раке молочной железы (Kuznetsova et al., 2007). VCPIP1 – это один из деубиквитирующих ферментов, являющийся членом семейства белков, определяющих наследственную предрасположенность к развитию опухолей яичника (OTU) (Enesa and Evans, 2014).

ZNF131 кодирует белок 131 с доменом zinc finger, слабо охарактеризованный транскрипционный регулятор, который, возможно, выступает в роли репрессора рецептора эстрогенов альфа (Oh and Chung, 2012).

Настоящее изобретение, более того, относится к пептидам по настоящему изобретению, имеющим способность связываться с молекулой главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) I или II класса.

Настоящее изобретение далее относится к пептидам по настоящему изобретению, где указанные пептиды (каждый из них) состоят или состоят по существу из аминокислотной последовательности по SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 325, SEQ ID NO: 326 по SEQ ID NO: 447 или SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 605.

Пептид, состоящий, по существу, из аминокислотной последовательности, как указано выше, может иметь замену одной или двух некорректных 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 пептиде, состоящем, по существу, из аминокислотной последовательности, одна или две аминокислоты заменены их консервативными партнерами обмена (см. также 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.

Настоящее изобретение далее относится к пептидам по настоящему изобретению, где указанный пептид модифицирован и/или включает непептидные связи.

Настоящее изобретение далее относится к пептидам по настоящему изобретению, 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 к дендритным клеткам.

Настоящее изобретение далее относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей пептиды по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение далее относится к нуклеиновой кислоте по настоящему изобретению, которая является ДНК, кДНК, ПНК, РНК или их комбинациями.

Настоящее изобретение далее относится к вектору экспрессии, способному к экспрессии или экспрессировать нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение далее относится к пептиду по настоящему изобретению, к нуклеиновой кислоте по настоящему изобретению или к вектору экспрессии по настоящему изобретению для применения в медицине.

Настоящее изобретение далее относится к антителам по настоящему изобретению и способам их получения.

Настоящее изобретение далее относится к Т-клеточным рецепторам (ТКР), в частности к растворимым ТКР, по настоящему изобретению и способам их получения.

Настоящее изобретение далее относится к клетке-хозяину, включающей нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению или вектор экспрессии, описанный ранее.

Настоящее изобретение далее относится к клетке-хозяину по настоящему изобретению, которая является антиген-презентирующей клеткой.

Настоящее изобретение далее относится к клетке-хозяину по настоящему изобретению, где антиген-презентирующая клетка является дендритной клеткой.

Настоящее изобретение далее относится к способу получения пептида по настоящему изобретению, причем способ включает культивацию клетки-хозяина по настоящему изобретению и выделение пептида из клетки-хозяина или его культуральной среды.

Настоящее изобретение далее относится к способу получения активированных цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) *in vitro*, причем способ включает контактирование ЦТЛ *in vitro* с нагруженными антигеном молекулами человеческого МНС I или II класса, экспрессированными на поверхности подходящей антигенпрезентирующей клетки в течение периода времени, достаточного для активации антиген-специфическим образом указанных ЦТЛ, где указанный антиген является любым пептидом по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение далее относится к способу по настоящему изобретению, 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 описанному способу, где антигенпрезентирующая клетка включает вектор экспрессии, способный экспрессировать указанный пептид, содержащий последовательность с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 325, SEQ ID NO: 326 по SEQ ID NO: 447 или с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 605 или указанную вариантную аминокислотную последовательность.

Настоящее изобретение далее относится к активированным цитотоксическим Т-лимфоцитам (ЦТЛ), полученным способом по настоящему изобретению, которые селективно распознают клетку, которая аберрантно экспрессирует полипептид, включающий аминокислотную последовательность по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение далее относится к способу уничтожения клеток-мишеней у пациента, чьи клетки-мишени аберрантно экспрессируют полипептид, включающий любую аминокислотную последовательность по настоящему изобретению, причем способ включает введение пациенту эффективного числа цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение далее относится к применению любого описанного пептида, нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектора экспрессии по настоящему изобретению, клетки по настоящему изобретению или активированного цитотоксического Т-лимфоцита по настоящему изобретению в качестве лекарственного средства или в производстве лекарственного средства.

Настоящее изобретение далее относится к способу применения по настоящему изобретению, где лекарственное средство является вакциной.

Настоящее изобретение далее относится к способу применения по настоящему изобретению, где лекарственное средство проявляет противораковую активность.

Настоящее изобретение далее относится к способу применения по настоящему изобретению, где указанные раковые клетки являются клетками гематологических злокачественных заболеваний, клетками ОМЛ или хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ).

Настоящее изобретение далее относится к конкретным белкам-маркерам и биомаркерам, основанным на пептидах по настоящему изобретению, которые могут быть использованы при постановке диагноза и/или составлении прогноза течения гематологических злокачественных заболеваний, клеток ОМЛ или хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), предпочтительно ОМЛ.

Кроме того, настоящее изобретение относится к применению этих новых мишеней для лечения рака.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу получения персонализированной противораковой вакцины для отдельного пациента с

использованием «хранилища» (банка данных) предварительно прошедших скрининг опухолеассоциированных пептидов.

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 цитотоксических Т-клеток (ЦТЛ) 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 цитозоли. Молекулы МНС человека называются также человеческими лейкоцитарными антигенами (HLA).

Существуют два класса молекул МНС: молекулы МНС I класса, встречающиеся на большинстве клеток, имеющих ядро. Молекулы МНС состоят из альфа-тяжелой цепи и бета-2-микроглобулина (рецепторы МНС I класса) или альфа- и бета-цепи (рецепторы МНС II класса), соответственно. Их трехмерная форма образует связывающую бороздку, которая используется для нековалентного взаимодействия с пептидами. МНС I класса презентируют пептиды, образующиеся при протеолитическом расщеплении преимущественно эндогенных белков, DRIP и более крупных пептидов. Молекулы МНС II класса могут встречаться преимущественно на профессиональных антигенпрезентирующих клетках (АПК) и, в первую очередь, презентировать пептиды экзогенных или трансмембранных белков, которые поглощаются АПК в период эндоцитоза и впоследствии процессируются. Комплексы из пептида и молекул МНС I класса распознаются CD8-положительными цитотоксическими Т-лимфоцитами, несущими подходящий ТКР (Т-клеточный рецептор), тогда как комплексы из 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 опухолеассоциированных антигенов (ТАА), может быть чрезвычайно важна для разработки фармацевтических препаратов для инициации противоопухолевых иммунных ответов Gnjatic S, et al. Survey of naturally occurring CD4+ T cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: correlation with antibody responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 22;100(15):8862-7). В области опухоли Т-хелперные клетки поддерживают благоприятное для ЦТЛ цитокиновое окружение (Mortara L, et al. CpTA-induced MHC class II expression in mammary adenocarcinoma leads to a Th1 polarization of the tumor microenvironment, tumor rejection, and specific antitumor memory. *Clin Cancer Res*. 2006 Jun 1;12(11 Pt 1):3435-43) и привлекают эффекторные клетки, к примеру, ЦТЛ, естественные киллерные клетки (NK), макрофаги, гранулоциты (Hwang ML, et al. Cognate memory CD4+ T cells generated with dendritic cell priming influence the expansion, trafficking, and differentiation of secondary CD8+ T cells and enhance tumor control. *J Immunol*. 2007 Nov 1;179(9):5829-38).

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. Неожиданно было обнаружено, что клетки опухоли больных раком пациентов экспрессируют молекулы МНС II класса (Dengjel J, et al. Unexpected abundance of HLA class II presented peptides in primary renal cell carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2006 Jul 15;12(14 Pt 1):4163-70).

На моделях млекопитающих животных, например, мышах, было показано, что даже при отсутствии эффекторных клеток, таких как ЦТЛ (т. е. CD8-положительных Т-лимфоцитов), CD4-положительных Т-клеток достаточно для ослабления клинических проявлений опухолей посредством ингибирования ангиогенеза при секреции интерферон-гамма (IFN γ).

К тому же было показано, что CD4-положительные Т-клетки, распознающие пептиды из опухолеассоциированных антигенов, презентированные молекулами HLA II класса, могут препятствовать опухолевой прогрессии посредством индукции ответов антител (Ab).

В отличие от опухолеассоциированных пептидов, связывающихся с молекулами HLA I класса, до сих пор было описано лишь небольшое число лигандов II класса для опухолеассоциированных антигенов (ТАА).

Так как конститутивная экспрессия молекул HLA II класса обычно ограничена клетками иммунной системы, то выделение пептидов II класса непосредственно из первичных опухолей считалось невозможным. Тем не менее, Dengjel с соавторами удалось идентифицировать ряд эпитопов МНС II класса непосредственно из опухолей (WO 2007/028574, EP 1 760 088 B1; (Dengjel et al., 2006).

Антигены, которые распознаются специфическими цитотоксическими Т-лимфоцитами опухоли, 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, имеют повышенный уровень в клетках соответствующей опухоли.

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+ ЦТЛ (лиганд: молекула МНС I класса + пептидный эпитоп), так и CD4-положительными хелперными Т-клетками (лиганд: молекула МНС II класса + пептидный эпитоп) являются важными при разработке противоопухолевых вакцин.

Настоящее изобретение также относится к двум новым и очень полезным пептидам, связанным с молекулами МНС II класса (содержащим последовательности по SEQ ID NO 448 по SEQ ID NO: 605). Данные пептиды особенно пригодны для постановки диагноза и/или лечения ОМЛ и других видов рака, клетки которых в избытке

экспрессируют и/или презентируют антигены, из которых образованы пептиды, соответственно.

Настоящее изобретение также относится к так называемым «вариантам по длине» пептидов по изобретению, связанных с молекулами МНС II класса согласно SEQ ID NO 448 по SEQ ID NO 605.

Варианты по длине, как правило, являются пептидами с удлинениями на N- и/или C-конце (от 1 до 5, предпочтительно от 1 до 10 аминокислотных остатков), или укорочениями на N- и/или C-конце (от 1 до 5, предпочтительно от 1 до 10 аминокислотных остатков), которые все еще могут связываться с МНС и вызывать клеточный иммунный ответ по настоящему описанию. Как известно из уровня техники, пептиды, связывающиеся с белками II класса, не ограничены по размеру и могут варьироваться по длине от 11 до 30 аминокислот. Связывающая бороздка молекул МНС II класса для пептидов открыта с обоих концов, что позволяет связываться с пептидами относительно большей длины. Хотя центральный «срединный» сегмент из девяти остатков в наибольшей степени способствует распознаванию пептида, примыкающие участки также важны для специфичности пептида относительно аллеля II класса (см., например, Meydan C, et al., Prediction of peptides binding to MHC class I and II alleles by temporal motif mining. BMC Bioinformatics. 2013; 14 Suppl 2: S13.). Используя как можно больше имеющихся инструментов программного обеспечения (например, как описываемые выше), специалист данной области будет способен идентифицировать связывающий мотив и, таким образом, определить возможности для удлинения цепи и/или укорочений пептидов, связанных с молекулами МНС II класса, по Таблицей 3 в целях получения вариантов по длине.

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

мотив», определяющий, какие пептиды могут специфически связываться со связывающей бороздкой.

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

Антигены, которые распознаются специфическими цитотоксическими Т-лимфоцитами опухоли, 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, имеют повышенный уровень в клетках соответствующей опухоли.

Современная классификация опухолеассоциированных антигенов включает следующие основные группы:

а) Раково-тестикулярные антигены: первые в истории идентифицированные опухолеассоциированные антигены (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 или NY-ESO-1.

б) Антигены дифференциации: данные ТАА встречаются в опухолевых и нормальных тканях, из которых образуется опухоль; большинство из них 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 PSA для рака предстательной железы.

в) Экспрессированные в избытке ТАА: гены, кодирующие широко экспрессированные ТАА, были обнаружены в различных по гистологической структуре опухолях, а также во многих нормальных тканях, в основном, с более низким уровнем экспрессии. Возможно, что многие эпитопы, процессируемые и потенциально презентруемые нормальными тканями, находятся ниже порогового уровня для распознавания Т-клетками, в то время как их избыточная экспрессия в опухолевых клетках может инициировать противораковый ответ, нарушая установившуюся ранее толерантность. Известными примерами ТАА этого класса являются Her-2/neu, 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 релевантны только для определенной опухоли, на которой они были идентифицированы, и обычно не являются общими для многих отдельных опухолей.

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

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

Для того чтобы белки были распознаны цитотоксическими Т-лимфоцитами в качестве опухолеспецифического или –ассоциированного антигена, 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; или в другом 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 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. The Tübingen approach: identification, selection, and validation of tumor-associated HLA peptides for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2004 Mar;53(3):187-95). В обоих случаях необходимо, чтобы эпитопы присутствовали в аминокислотной последовательности антигена, поскольку такой пептид («иммуногенный пептид»), который образован из опухолеассоциированного антигена, должен вести *in vitro* или *in vivo* к Т-клеточному ответу.

В 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 опухолеассоциированные антигены (ТАА) являются отправным пунктом для разработки противораковой вакцины. Методы идентификации и определения характеристики ТАА основаны на использовании ЦТЛ, 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 ТКР и антител по изобретением иммуногенность базовых пептидов является второстепенной. Для ТКР и антител по изобретением определяющим фактором является презентация.

Т-хелперные клетки играют важную роль в управлении эффекторной функцией ЦТЛ в противоопухолевом иммунитете. Эпитопы Т-хелперных клеток, инициирующие ответы Т-хелперных клеток типа T_H1 , поддерживают эффекторные функции CD8-положительных киллерных Т-клеток, которые включают цитотоксические функции, направленные против опухолевых клеток, экспонирующих комплексы опухолеассоциированного пептида и МНС на их клеточной поверхности. Таким образом, опухолеассоциированные пептидные эпитопы Т-хелперных клеток, одни или в комбинации с другими опухолеассоциированными пептидами, могут служить в качестве активных фармацевтических ингредиентов вакцинных композиций, которые стимулируют противоопухолевые иммунные ответы.

Способы применения против других видов рака раскрыты в последующем более подробном описании пептидов по изобретением.

Подробное описание изобретения

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

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

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

Понятие «пептиды по настоящему изобретению» включает пептиды, состоящие из или включающие пептид, как определено выше по SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 325, SEQ ID NO: 326 по SEQ ID NO: 447 или с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 605.

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

Пептид, олигопептид, белок или полинуклеотид, кодирующий такую молекулу, является «иммуногенным» (и, таким образом, «иммуногеном» в рамках настоящего изобретения), если он способен индуцировать иммунный ответ. В случае настоящего изобретения иммуногенность получает более специфическое определение как способность индуцировать Т-клеточный ответ. Таким образом, «иммуноген» будет представлять собой молекулу, которая способна индуцировать иммунный ответ, и, в случае настоящего изобретения, молекулу, способную индуцировать Т-клеточный ответ. В другом аспекте иммуноген может быть пептидом, комплексом из 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 6: Частоты экспрессии F HLA*A02 и наиболее частых серологических видов HLA-DR. Частоты экспрессии выведены из частот гаплотипа G_f среди американцев, приводимых в работе Mori и соавт. (Mori M, et al. HLA gene and haplotype frequencies in the North American population: the National Marrow Donor Program Donor Registry. Transplantation. 1997 Oct 15;64(7):1017-27), с использованием формулы Харди-Вейнберга $F=1-(1-G_f)^2$. Комбинации A*02 с определенными аллелями HLA-DR вследствие неравномерного распределения связей могут быть обогащенными или менее частыми, чем ожидается от их индивидуальных частот выявления. Более подробная информация

представлена в работе Chanock и соавт. (S.J. Chanock, et al (2004) HLA-A, -B, -Cw, -DQA1 and DRB1 in an African American population from Bethesda, USA Human Immunology, 65: 1223-1235).

	Частоты экспрессии HLA*02 и серотипов HLA-DR в подгруппах североамериканского населения			
Аллель HLA	Американцы европеоидной расы	Афроамериканцы	Монголоиды	Латиноамериканцы
A*02	49,1%	34,1%	43,2%	48,3%
DR1	19,4%	13,2%	6,8%	15,3%
DR2	28,2%	29,8%	33,8%	21,2%
DR3	20,6%	24,8%	9,2%	15,2%
DR4	30,7%	11,1%	28,6%	36,8%
DR5	23,3%	31,1%	30,0%	20,0%
DR6	26,7%	33,7%	25,1%	31,1%
DR7	24,8%	19,2%	13,4%	20,2%
DR8	5,7%	12,1%	12,7%	18,6%
DR9	2,1%	5,8%	18,6%	2,1%

Поэтому для терапевтических и диагностических целей крайне желателен пептид, который связывается с подходящей аффинностью с несколькими различными рецепторами HLA II класса. Пептид, связывающийся с несколькими различными молекулами HLA II класса, называется способным к промискуитетному связыванию.

Используемая в контексте данного описания ссылка на последовательность ДНК включает как одонитевую, так и двухнитевую ДНК. Таким образом, 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 из не мутировавшего («нормального»), мутировавшего или измененного гена или может даже быть из последовательности ДНК, или же гена, целиком синтезированного в лаборатории с использованием методов, хорошо известных специалистам области синтеза ДНК.

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.

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

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

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

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

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

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

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

Полинуклеотиды и рекомбинантные или иммуногенные полипептиды, раскрытые по настоящему 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, по тем, как эти термины понимаются специалистами соответствующей области. Например, отдельные клоны, выделенные из

библиотеки кДНК, как обычно очищались до электрофоретической чистоты. Очистка исходного материала или природного материала от примесей по меньшей мере на один порядок величины, предпочтительно два или три порядка, и, более предпочтительно, четыре или пять порядков величины определенно рассматривается в изобретении. Более того, определенно рассматривается 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 по 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, который дает иммунный ответ (т.е. обладает иммуногенной активностью), если он введен отдельно или факультативно с подходящим адъювантом животному, такому как млекопитающее, например, кролику или мышь, 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.

По настоящему изобретению 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) 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.

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, аминокислоты, содержащие нестандартные R-группы (т.е. R-группы, отличающиеся от обнаруженных в повсеместно встречающихся 20 аминокислотах природных белков) могут быть также использованы в целях замены для получения иммуногенов и иммуногенных полипептидов по настоящему изобретению.

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 замены должны производиться не более чем в 4 позициях внутри пептида одновременно.

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 элонгации по изобретению могут быть взяты из следующей Таблицы 7:

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

1	0 или 1 или 2 или 3
0	0 или 1 или 2 или 3 или 4

Аминокислотами для элонгации могут быть пептиды исходной последовательности белка или любая другая аминокислота. Элонгация может быть использована для повышения стабильности или растворимости пептидов.

Понятие «Т-клеточный ответ» означает специфическую пролиферацию и активацию эффекторных функций, индуцированных пептидом *in vitro* или *in vivo*. Для ЦТЛ, 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.

Предпочтительно, чтобы ЦТЛ, специфичные для пептида по 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 ЦТЛ более чем одного индивида, по меньшей мере двух и, более предпочтительно, трех индивидов.

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

Стимуляция иммунных ответов зависит от присутствия антигенов, распознаваемых иммунной системой хозяина как чужеродные. Открытие существования

опухолеассоциированных антигенов повысило сейчас возможность использования иммунной системы хозяина для вмешательства в рост опухоли. В настоящее время исследуются различные механизмы использования для иммунотерапии рака обеих ветвей иммунной системы, как гуморальной, так и клеточной.

Специфические элементы клеточных иммунных ответов способны к специфическому распознаванию и уничтожению опухолевых клеток. Выделение цитотоксических Т-клеток (ЦТЛ) 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 молекулы I класса главного комплекса гистосовместимости (МНС), связанные с пептидами, имеющими обычно 8-12 аминокислотных остатков, образованных из белков или дефектных рибосомных продуктов (DRIP), находящихся в цитозоли, играют важную роль в этом ответе. Молекулы МНС человека называются также человеческими лейкоцитарными антигенами (HLA).

Молекулы МНС I класса могут встречаться на большинстве клеток, имеющих ядро, которые презентуют пептиды, образующиеся после протеолитического расщепления преимущественно эндогенных, цитозольных или ядерных белков, 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.

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-положительными ЦТЛ (молекула МНС I класса), так и CD4-положительными ЦТЛ (молекула МНС II класса) являются важными при разработке противоопухолевых вакцин. Поэтому целью настоящего изобретения является предложить композиции пептидов, которые содержат пептиды, связывающиеся с комплексами МНС любого класса.

Ввиду серьезных побочных эффектов и расходов, связанных с лечением рака, крайне необходимы улучшенные методы прогнозирования и диагностики. Поэтому существует

необходимость в идентификации других факторов, представляющих собой биомаркеры рака вообще и рака легких, в частности. Кроме того, существует необходимость в идентификации факторов, которые могут быть использованы при лечении рака вообще и ОМЛ в частности.

В настоящем изобретении предложены пептиды, которые пригодны для лечения раковых заболеваний / опухолей, предпочтительно раковых заболеваний легких, еще более предпочтительно ОМЛ, и других видов рака (см. Таблицу 5), клетки которых экспрессируют в избытке или презентируют исключительно пептиды по изобретению. Как показал масс-спектрометрический анализ, эти пептиды естественно презентировались молекулами HLA на образцах первичного ОМЛ человека.

Как было показано, исходный ген/белок (называемый также «белком полной длины» или «базовым белком»), из которого были получены пептиды, был в высокой степени избыточно экспрессирован в опухолевой ткани по сравнению с нормальными тканями (см. Пример 1 и Фигуру 2 для ОМЛ), демонстрируя высокую степень ассоциации исходных генов с опухолью. Более того, сами пептиды избыточно презентуются на опухолевой ткани, но не на нормальных тканях (см. Пример 1 и Фигуру 3).

Связанные с HLA пептиды могут распознаваться иммунной системой, конкретно Т-лимфоцитами/Т-клетками. Т-клетки могут разрушать клетки, презентующие распознанный комплекс HLA/пептид; к примеру, клетки рака легких, презентующие полученные пептиды.

Было показано, что пептиды по настоящему изобретению способны стимулировать Т-клеточные ответы и/или избыточно презентуются и, поэтому, могут использоваться для получения антител и/или ТКР, в частности растворимых ТКР, по настоящему изобретением (см. Пример 1 и Фигуру 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, по настоящему изобретением. Соответствующие способы хорошо известны специалисту данной области, а также могут быть найдены в соответствующих литературных источниках. Таким образом, пептиды по настоящему изобретению пригодны для генерирования иммунного ответа в организме пациента для уничтожения опухолевых клеток.

Иммунный ответ у пациента может быть индуцирован при непосредственном введении описанных пептидов или подходящих веществ-предшественников (к примеру, удлиненных пептидов, белков или нуклеиновых кислот, кодирующих эти пептиды) пациенту, в идеальном случае в комбинации с веществом, усиливающим иммуногенность (т. е. адъювантом). Можно ожидать, что иммунный ответ, вызванный такой терапевтической вакцинацией, будет высоко специфично направлен против опухолевых клеток, так как целевые пептиды по настоящему изобретению не презентуются на нормальных тканях в сравнимом количестве копий, предотвращая, тем самым, риск нежелательных аутоиммунных реакций против нормальных клеток у пациента.

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 (в основном, где нейтральная форма лекарственного средства имеет нейтральную группу $-NH_2$) с использованием 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).

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 рака легкого*, 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 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 ткань является злокачественной или воспаленной или же пораженной заболеванием вообще. 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 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».

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

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

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

поликлональным антителом, моноклональным антителом, биспецифичным антителом и/или химерным антителом.

Кроме того, еще один аспект настоящего изобретения относится к способу получения указанного антитела, специфически связывающегося с главным комплексом гистосовместимости человека (МНС) I или II класса в комплексе с HLA-рестриктированным антигеном, причем этот способ включает: иммунизацию полученного с помощью методов генной инженерии не являющегося человеком млекопитающего, содержащего клетки, экспрессирующие указанный главный комплекс гистосовместимости человека (МНС) I или II класса с растворимой формой молекулы МНС I или II класса в комплексе с указанным HLA-рестриктированным антигеном; выделение молекул мРНК из продуцирующих антитела клеток указанного не являющегося человеком млекопитающего; получение 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 HLA-рестриктированным антигеном. 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 работе Cohen CJ et al. Recombinant antibodies with MHC-restricted, peptide-specific, T-cell receptor-like specificity: new tools to study antigen presentation and TCR-peptide-MHC interactions. J Mol Recognit. 2003 Sep-Oct;16(5):324-32.; Denkberg G, et al. Selective targeting of melanoma and APCs using a recombinant antibody with TCR-like specificity directed toward a melanoma differentiation antigen. J Immunol. 2003 Sep 1;171(5):2197-207; and Cohen CJ, et al. Direct phenotypic analysis of human MHC class I antigen presentation: visualization, quantitation, and in situ detection of human viral epitopes using peptide-specific, MHC-restricted human recombinant antibodies. J Immunol. 2003 Apr 15; 170(8):4349-61, 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 называется «специфическим» в контексте настоящего изобретения.

В другом аспекте изобретения предложен способ получения растворимого Т-клеточного рецептора, распознающего специфический 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 N, et al. Monoclonal TCR-redirected tumor cell killing. *Nat Med* 2012 Jun;18(6):980-987). В целях стабилизации Т-клеточных рецепторов во время 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 (см. Boulter JM et al. Stable, soluble T-cell receptor molecules for crystallization and therapeutics. *Protein Eng* 2003 Sep;16(9):707-711.; Card KF, et al. A soluble single-chain T-cell receptor IL-2 fusion protein retains MHC-restricted peptide specificity and IL-2 bioactivity. *Cancer Immunol Immunother* 2004 Apr;53(4):345-357; and Willcox BE, et al. Production of soluble alphabeta T-cell receptor heterodimers suitable for biophysical analysis of ligand binding. *Protein Sci* 1999 Nov; 8(11):2418-2423). В целях выполнения определенных функций на клетках-мишенях Т-клеточный рецептор может быть связан с токсинами, лекарственными средствами, цитокинами (см. заявку США 2013/0115191), 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.

Кроме того, они могут быть использованы для подтверждения диагноза рака, поставленного патологом на основании исследования биоптата.

Для выбора презентруемых в избытке пептидов был рассчитан профиль презентации, позволяющий оценить медианное значение презентации образца, а также вариации повторных измерений. В профиле сравниваются образцы опухолевой формы, представляющей интерес, с фоновым уровнем образцов нормальной ткани. Каждый из этих профилей может быть затем консолидирован в показатель избыточной презентации путем расчета значения p по линейной модели со смешанными эффектами (J. Pinheiro, et al. The nlme Package: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. 2007), скорректировав ее для повторных анализов на уровень ложноположительных результатов (Y. Benjamini and Y. Hochberg. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological), Vol.57 (No.1):289-300, 1995).

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

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 презентруемых пептидов в качестве кандидатов для вакцины, основываясь на прямом относительном количественном определении уровней HLA-рестриктированных пептидов на раковой ткани в сравнении с несколькими различными нераковыми тканями и органами. Это

было осуществлено путем разработки дифференциального количественного определения на основе данных ЖХ-МС без использования изотопной метки (label-free), обработанных запатентованной технологической платформой для анализа данных, объединяющей алгоритмы для идентификации последовательности, спектральной кластеризации, подсчета ионов, выравнивания времени удерживания, деконволюции по состояниям заряда и нормализации.

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

В контексте настоящего изобретения комплексы HLA-пептид, полученные из более 50 образцов опухолевой ткани ОМЛ, подвергнутых шоковой заморозке, были очищены; HLA-ассоциированные пептиды были выделены и проанализированы методом ЖХ-МС (см. примеры). Все TUMAP, содержащиеся в настоящей патентной заявке, были идентифицированы с помощью этого подхода на образцах первичных опухолей ОМЛ, что подтверждает их презентацию на клетках первичного ОМЛ.

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

Таким образом, настоящее изобретение относится к пептиду, включающему последовательность, выбранную из группы с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 325, SEQ ID NO: 326 по SEQ ID NO: 447 или с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 605, или его варианту,

который по меньшей мере на 90% гомологичен (предпочтительно, идентичен) последовательности с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 325, SEQ ID NO: 326 по SEQ ID NO: 447 или с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 605, или его варианту, который индуцирует Т-клеточную перекрестную реакцию с указанным пептидом, где указанный пептид не является полипептидом полной длины.

Настоящее изобретение далее относится к пептиду, включающему последовательность, которая выбрана из группы с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 325, SEQ ID NO: 326 по SEQ ID NO: 447 или с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 605, или его варианту, который по меньшей мере на 90% гомологичен (предпочтительно, идентичен) последовательности с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 325, SEQ ID NO: 326 по SEQ ID NO: 447 или с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 605, 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 по изобретением, способным связываться с молекулой главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) I или II класса.

Настоящее изобретение далее относится к пептидам, описанным ранее, где пептид состоит или состоит, по существу, из аминокислотной последовательности по SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 325, SEQ ID NO: 326 по SEQ ID NO: 447 или с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 605.

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

Настоящее изобретение далее относится к пептидам по 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 по изобретением, при условии, что пептид не является полностью человеческим белком.

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

Настоящее изобретение далее относится к вектору экспрессии, способному экспрессировать нуклеиновую кислоту по изобретением.

Настоящее изобретение далее относится к пептиду по изобретением, к нуклеиновой кислоте по изобретением или к вектору экспрессии по изобретением для применения в медицине.

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

Настоящее изобретение далее относится к клетке-хозяину по изобретением, которая является антиген-презентирующей клеткой.

Настоящее изобретение далее относится к клетке-хозяину по изобретением, где антиген-презентирующая клетка является дендритной клеткой.

Настоящее изобретение далее относится к способу получения пептида по изобретением, причем способ включает культивацию описанной клетки-хозяина и выделение пептида из клетки-хозяина или его культуральной среды.

Настоящее изобретение далее относится к способу получения активированных цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) *in vitro*, причем способ включает контактирование ЦТЛ *in vitro* с нагруженными антигеном молекулами человеческого МНС I или II класса, экспрессированными на поверхности подходящей антигенпрезентирующей клетки на период времени, достаточного для активации антиген-специфическим образом указанных ЦТЛ, где указанный антиген является любым пептидом по изобретением.

Настоящее изобретение далее относится к описанному способу, где указанный 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 по изобретением, где антигенпрезентирующая клетка включает вектор экспрессии, способный экспрессировать указанный пептид, содержащий SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 325, SEQ ID NO: 326 по SEQ ID NO: 447 или с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 605 или указанную вариантную аминокислотную последовательность.

Настоящее изобретение далее относится к активированным цитотоксическим Т-лимфоцитам (ЦТЛ), полученным способом по изобретением, которые селективно распознают клетку, которая аберрантно экспрессирует полипептид, включающий описанную аминокислотную последовательность.

Настоящее изобретение далее относится к способу уничтожения клеток-мишеней у пациента, чьи клетки-мишени аберрантно экспрессируют полипептид, включающий любую аминокислотную последовательность по изобретением, причем способ включает введение пациенту эффективного числа цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) по изобретением.

Настоящее изобретение далее относится к применению любого пептида по изобретением, нуклеиновой кислоты по изобретением, вектора экспрессии по изобретением, клетки по изобретением или активированного цитотоксического Т-лимфоцита по изобретением в качестве лекарственного средства или в производстве лекарственного средства.

Настоящее изобретение далее относится к способу применения по изобретением, где лекарственное средство является вакциной.

Настоящее изобретение далее относится к способу применения по изобретением, где лекарственное средство проявляет противораковую активность.

Настоящее изобретение далее относится к способу применения по изобретением, где указанные раковые клетки являются клетками ОМЛ или клетками других несолидных опухолей.

Настоящее изобретение далее относится к конкретным белкам-маркерам и биомаркерам, которые могут быть использованы для прогнозирования рака легких.

Кроме того, настоящее изобретение относится к применению новых мишеней, как описано по настоящим изобретением 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 или полимеры таких молекул иммуноглобулина и гуманизированные версии молекул иммуноглобулина, при условии, что они проявляют любое из желаемых свойств (например, специфически связываются с полипептидным маркером рака легких, доставляют токсин к клетке рака легких, экспрессирующей ген-маркер рака легких на повышенном уровне и/или ингибируют активность ракового полипептида-маркера) по настоящим изобретением.

Если возможно, антитела по изобретению могут быть куплены в коммерческих источниках. Антитела по изобретению могут быть также получены при использовании хорошо известных способов. Опытному специалисту будет понятно, что для получения антител по изобретению могут использоваться как полипептидные маркеры рака легких 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 по настоящим изобретением, такой как пептид с последовательностью с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 325, SEQ ID NO: 326 по SEQ ID NO: 447 или с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 605, полипептид или вариант или его фрагмент может быть экспрессирована в прокариотических клетках (например, бактерий) или эукариотических клетках (например, дрожжей, насекомых или клетках

млекопитающих), после чего рекомбинантный белок может быть очищен и использован в получении препарата из моноклональных или поликлональных антител, которые специфически связываются с полипептидным маркером рака легкого, 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 испытаны на желаемую для них активность с помощью известных методов по цели применения антител (например, ELISA, иммуногистохимия, иммунотерапия и т. д.; для получения дальнейшей информации по генерированию и испытанию антител см., например, Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988, new 2nd edition 2013). Например, антитела могут быть исследованы с помощью ELISA, метода иммунного блоттинга (Western-blot), иммуногистохимического окрашивания законсервированных формальдегидом образцов рака легкого или замороженных тканевых срезов. После первоначального определения их характеристик *in vitro* антитела, предназначенные для терапевтического или диагностического применения *in vivo* исследуют по известными клиническими методами анализа.

Понятие «моноклональное антитело» в контексте настоящего изобретения обозначает антитело, полученное из, по существу, гомогенной популяции антител, т. е. отдельные антитела внутри популяции идентичны за исключением возможных естественных мутаций, которые могут быть представлены в 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 избранные 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 определяющего комплементарность участка (CDR) реципиента замещены остатками из CDR биологических видов, не являющихся человеком (донорское антитело), таких как мыши, крысы или кролики, имеющими желаемую специфичность, аффинность и связывающая способность. В некоторых случаях остатки Fv-каркаса (FR) человеческого иммуноглобулина замещены соответствующими остатками нечеловеческого происхождения. Гуманизированные антитела могут также включать остатки, которые не встречаются ни в 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 в обязательном порядке менее чем один интактный человеческий переменный домен был заменен соответствующей последовательностью нечеловеческого вида. На практике гуманизированные антитела являются обычно человеческими антителами, в которых некоторые остатки CDR и, возможно, остатки FR заменены на остатки аналогичных сайтов антител грызунов.

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

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

носители могут быть более предпочтительными в зависимости от, например, способа введения и концентрации вводимого антитела.

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

Эффективная дозировка и режим введения антител могут быть определены эмпирически, а принятие таковых решений под силу специалисту данной области. Специалистам данной области будет понятно, что дозировка антител, которые должны быть введены, будет варьироваться в зависимости от, например, субъекта, которому будет вводиться антитело, способа введения, конкретного типа используемого антитела и других вводимых медикаментов. Типичная дневная дозировка антитела, используемого отдельно, может варьироваться от около 1 мкг/кг вплоть до 100 мг/кг массы тела или более в день, в зависимости от факторов, упоминаемых выше. После введения антитела для лечения рака легкого эффективность терапевтического антитела может быть оценена различными способами, известными компетентному специалисту данной области. Например, размер, количество и/или распределение рака легкого в организме 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 легкого.

Поскольку пептиды по изобретению, указанные в Таблицах 2 и 5 (в особенности те, что ассоциированы с ОМЛ), и, таким образом, их базовые полипептиды высоко экспрессированы в клетках ОМЛ и экспрессированы на достаточно или чрезвычайно низких уровнях в нормальных клетках, ингибирование экспрессии ABCA13 и/или

ММР12 или активности полипептида может быть предпочтительно интегрировано в любую терапевтическую стратегию лечения или предупреждения ОМЛ.

Принцип антисмысловой терапии основан на гипотезе, что последовательность-специфическое подавление генной экспрессии (посредством транскрипции или трансляции) может быть достигнуто при внутриклеточной гибридизации между геномной ДНК или мРНК и комплементарными антисмысловыми соединениями. Образование такого гибридного дуплекса нуклеиновых кислот препятствует транскрипции геномной ДНК, кодирующей опухолевый антиген-мишень, или процессингу/транспорту/трансляции и/или стабильности мРНК опухолевого антигена-мишени.

Антисмысловые нуклеиновые кислоты могут быть доставлены с использованием различных подходов. Например, антисмысловые олигонуклеотиды или антисмысловая РНК могут вводиться непосредственно (например, внутривенной инъекцией) субъекту в форме, которая позволяет поглощение опухолевыми клетками. Альтернативно в клетки могут вводиться вирусные или плазмидные векторы *in vivo*, которые кодируют антисмысловую РНК (или фрагменты РНК). Антисмысловые эффекты также могут быть вызваны смысловыми последовательностями; однако степень фенотипических изменений крайне изменчива. Фенотипические изменения, индуцированные эффективной антисмысловой терапией, оцениваются по изменениям, например, уровнями мРНК-мишени, уровнями белка-мишени и/или уровнями активности белка-мишени.

В конкретном примере ингибирование функции маркера рака легкого с помощью генной терапии с применением антисмысловых конструкций может быть выполнено посредством прямого введения субъекту РНК комплементарной маркерной РНК опухоли легкого. РНК, комплементарную маркерной РНК опухоли, можно получить и выделить с помощью любой стандартной методики, но наиболее просто ее получить с помощью транскрипции *in vitro* с использованием ДНК, комплементарной маркерной ДНК опухоли, под контролем высокоэффективного промотора (например, Т7-промотора). Введение комплементарной маркерной РНК опухоли в клетки может быть произведено любым способом прямого введения нуклеиновых кислот, описываемым ниже.

Альтернативная стратегия ингибирования функции ABCA13 и MMP12 при использовании генной терапии включает внутриклеточную экспрессию антител к ABCA13 и MMP12 или фрагмента антител к ABCA13 и MMP12. Например, ген (или фрагмент гена), кодирующий моноклональное антитело, которое специфически связывается с полипептидом ABCA13, MMP12 и ингибирует его биологическую активность, помещают под контроль транскрипции специфической (например, ткане- или опухоль-специфической) регуляторной последовательности генов в пределах вектора экспрессии нуклеиновой кислоты. Вектор вводится затем субъекту так, чтобы он поглощался клетками рака легкого или другими клетками, которые затем секретируют антитела к ABCA13, MMP12 и, тем самым, блокируют биологическую активность полипептида ABCA13, MMP12. Предпочтительно, если полипептиды ABCA13, MMP12 присутствуют на внеклеточной поверхности раковых клеток ОМЛ.

В способах, описываемых выше, которые включают введение и поглощение экзогенной ДНК клетками субъекта (т. е. генную трансдукцию или трансфекцию), нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению могут быть в форме «обнаженной» ДНК, или же нуклеиновые кислоты могут быть в векторе для доставки нуклеиновых кислот к клеткам для ингибирования экспрессии белка-маркера опухоли ОМЛ. Вектор может представлять собой имеющийся в продаже препарат, такой как аденовирусный вектор (Quantum Biotechnologies, Inc. (Лаваль, Квебек, Канада). Доставка нуклеиновой кислоты или вектора к клеткам может производиться посредством различных механизмов. Например, доставка может производиться с помощью липосомы с использованием имеющихся в продаже липосомных препаратов, таких как LIPOFECTIN, LIPOFECTAMINE (GIBCO-25 BRL, Inc., Гейтерсберг, Мэриленд, США), SUPERFECT (Qiagen, Inc. Хильден, Германия) и TRANSFECTAM (Promega Biotec, Inc., Мэдисон, Висконсин, США), в равной степени как и других липосом, разработанных по стандартным процедурам уровня техники. Кроме того, нуклеиновая кислота или вектор по изобретению может быть доставлен *in vivo* посредством электропорации, технология которой имеется в наличии в компании Genetronics, Inc. (Сан-Диего, Калифорния, США), в равной степени как и с помощью устройства SONOPORATION machine (ImaRx Pharmaceutical Corp., Таксон, Аризона, США).

Одним из примеров является векторная доставка посредством вирусной системы, такой как ретровирусная векторная система, которая способна упаковывать рекомбинантный ретровирусный геном. Рекомбинантный ретровирус может быть затем использован, чтобы инфицировать и таким образом доставить к инфицированным клеткам антисмысловую нуклеиновую кислоту, которая ингибирует экспрессию ABCA13 и/или MMP12. Точный способ введения измененной нуклеиновой кислоты в клетки млекопитающего, разумеется, не ограничивается использованием ретровирусных векторов. Имеется широкий спектр других методик для данной процедуры, включая использование аденовирусных векторов, адено-ассоциированных вирусных (AAV) векторов, лентивирусных векторов, псевдотипированных ретровирусных векторов. Также могут применяться методики физической трансдукции, такие как липосомная доставка и рецептор-опосредованные и другие механизмы эндоцитоза. Данное изобретение может быть использовано вместе с любым из этих или других используемых обычно способов генного переноса.

Антитела 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 иммуносцинтиграфии. В одном варианте осуществления антитела или их фрагменты связываются с внеклеточными доменами двух или более мишеней ABCA13 и MMP12 при показателе аффинности (K_d) ниже чем 1×10^{-6} М.

Антитела для диагностических целей могут помечаться зондами, подходящими для обнаружения различными способами визуализации. Способы обнаружения зондов включают, но без ограничения, флуоресценцию, световую, конфокальную и электронную микроскопию; магнитно-резонансную томографию и спектроскопию; флуороскопию, компьютерную томографию и позитронно-эмиссионную томографию. Подходящие зонды включают, но без ограничения, флуоресцеин, родамин, эозин и другие флуорофоры, 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. Зафиксированные или залитые образцы срезов тканей приводят в контакт с помеченным первичным антителом и вторичным антителом, где антитело используется для обнаружения экспрессии белков ABCA13 и/или MMP12 *in situ*.

Таким образом, в настоящем изобретении предложен пептид, включающий последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 325, SEQ ID NO: 326 по SEQ ID NO: 447 или с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 605, или его вариант, который на 90% гомологичен последовательности с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 325, SEQ ID NO: 326 по SEQ ID NO: 447 или с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 605, или его вариант, который будет индуцировать Т-клеточную перекрестную реакцию с указанным пептидом.

Пептиды по изобретению обладают способностью связываться с молекулой главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) I и/или 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. Упомянувшееся ранее понятие «гомология» определяется при сравнении двух последовательностей, выравниваемых в оптимальных условиях для проведения сравнения 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 аналитические инструменты, предоставляемые банками данных свободного доступа.

Специалист в данной области будет в состоянии оценить, будут ли Т-клетки, индуцированные вариантом конкретного пептида, способны к перекрестной реакции с самим пептидом (Fong L, et al. Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Jul 17;98(15):8809-

14; Zaremba S, et al. Identification of an enhancer agonist cytotoxic T lymphocyte peptide from human carcinoembryonic antigen. *Cancer Res.* 1997 Oct 15;57(20):4570-7; Colombetti S, et al. Impact of orthologous melan-A peptide immunizations on the anti-self melan-A/HLA-A2 T cell cross-reactivity. *J Immunol.* 2006 Jun 1;176(11):6560-7; Appay V, et al. Decreased specific CD8⁺ T cell cross-reactivity of antigen recognition following vaccination with Melan-A peptide. *Eur J Immunol.* 2006 Jul;36(7):1805-14)..

Под понятием «вариант» данной аминокислотной последовательности изобретатели имеют в виду, что боковые цепи, например, одного или двух аминокислотных остатков изменены (например, при их замещении боковой цепью другого встречающегося в природе аминокислотного остатка или какой-либо другой боковой цепью), так что пептид по-прежнему способен связываться с молекулой HLA по существу таким же образом, как и пептид, состоящий из данной аминокислотной последовательности, состоящей из SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 325, SEQ ID NO: 326 по SEQ ID NO: 447 или с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 605. Например, пептид может быть модифицирован таким образом, что он по меньшей мере сохранит, если не улучшит, способность взаимодействовать и связываться со связывающей бороздкой подходящей молекулы МНС, такой как HLA-A*02 или -DR, и, таким образом, он по меньшей мере сохранит, если не улучшит, способность связываться с ТКР активированных ЦТЛ.

Данные ЦТЛ 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 (Godkin A, et al. Use of eluted peptide sequence data to identify the binding characteristics of peptides to the insulin-dependent diabetes susceptibility allele HLA-DQ8 (DQ 3.2). *Int Immunol.* 1997 Jun;9(6):905-11) и банков данных (Rammensee H. et al. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics.* 1999 Nov;50(3-4):213-9), конкретные позиции связывающихся с HLA пептидов обычно являются якорными остатками, формирующими центральную последовательность, подходящую к связывающему мотиву рецептора HLA, который определяется полярными, электрофизическими, гидрофобными и пространственными свойствами полипептидных цепей, образующих связывающую бороздку. Таким образом, специалист в данной области будет в состоянии модифицировать аминокислотные последовательности, предложенные в SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 325,

SEQ ID NO: 326 по SEQ ID NO: 447 или с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 605, сохраняя известные якорные остатки, и будет в состоянии определить, сохраняют ли такие варианты способность связываться с молекулами МНС I или II класса. Варианты по настоящему изобретению сохраняют способность связываться с ТКР активированных ЦТЛ, которые могут впоследствии вступать в перекрестную реакцию и уничтожать клетки, экспрессирующие полипептид, который содержит природную аминокислотную последовательность пептида по настоящим изобретением.

Те аминокислотные остатки, которые не вносят существенный вклад во взаимодействие с Т-клеточным рецептором, могут быть модифицированы заменой на другую аминокислоту, включение которой, по существу, 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.

Более длинные пептиды также могут быть пригодными. Также 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.

Соответственно, в настоящем изобретении предлагаются также 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 пептидов, связывающихся с молекулами МНС класса II, длина может также быть 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 23 аминокислоты.

Разумеется, пептид или вариант по настоящим изобретением будет обладать способностью связываться с молекулой главного комплекса гистосовместимости

человека (МНС) I класса. Связывание пептида или варианта с комплексом МНС может быть проверено способами, известными из уровня техники.

В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения пептид состоит или по существу состоит из аминокислотной последовательности по SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 325, SEQ ID NO: 326: по SEQ ID NO: 447 или с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 605.

«Состоящий по существу из» подразумевает, что пептид по настоящим изобретением, помимо последовательности по любой из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 325, SEQ ID NO: 326: по SEQ ID NO: 447 или с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 605 или один из его вариантов, содержит дополнительные находящиеся на N- и/или C-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 по настоящим изобретением в клетки. В одном варианте осуществления настоящего изобретения пептид является слитым белком, который включает, например, 80 N-терминальных аминокислот антиген-ассоциированной инвариантной цепи (p33, в дальнейшем "I") HLA-DR, как взятый из банка данных NCBI, инвентарный номер - GenBank Accession-number X00497. В других видах слияния пептиды по настоящему изобретению могут быть слиты с антителом, описанным в настоящем документе, или его функциональной частью, в частности встроены в последовательность антитела, так чтобы быть специфической мишенью указанного антитела, или, например, слиты с или встроены в антитело, являющееся специфическим для дендритных клеток.

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) J. Immunol. 159,3230-3237, включенной настоящее описание по ссылке. Этот подход охватывает получение псевдопептидов, которые содержат изменения, охватывающие остов, но не ориентацию боковых цепей. Meziere и соавторы (1997) показывают, что эти псевдопептиды пригодны для связывания с МНС и индукции ответов Т-хелперных клеток. Ретро-инвертированные пептиды, которые содержат связи NH-CO вместо пептидных связей CO-NH, намного более устойчивы к протеолизу.

Непептидной связью является, например, $-\text{CH}_2\text{-NH}$, $-\text{CH}_2\text{S-}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$, $-\text{CH}=\text{CH-}$, $-\text{COCH}_2\text{-}$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{-}$ и $-\text{CH}_2\text{SO-}$. В патенте США № 4 897 445 предлагается метод твердофазного синтеза непептидных связей ($-\text{CH}_2\text{-NH}$) в полипептидных цепях, который включает полипептиды, синтезированные с использованием стандартной методики, и непептидную связь, синтезированную при реакции аминокальдегида и аминокислоты в присутствии NaCNBH_3 .

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-флуоренилметокси-карбонильная группа может быть размещена на аминных концах пептидов. Кроме того, гидрофобная группа, трет-бутилоксикарбонильная или амидная группа может быть добавлена к карбоксильным концам пептидов.

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

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

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

Распространено также избирательное восстановление дисульфидных связей в белках. Дисульфидные связи могут быть образованы и окислены во время тепловой обработки биофармацевтических средств.

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

Например, диэтилпирокарбонат является реагентом для модификации 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 с помощью, например, 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 глутаральдегидом, полиэтиленгликоль-диакрилатом и формальдегидом используется для получения гидрогелей. Химическая модификация аллергенов для иммунотерапии часто достигается при карбамоилировании цианатом калия.

Пептид или вариант, в котором пептид модифицирован или включает непептидные связи, является предпочтительным вариантом осуществления изобретения. Как правило, пептиды и варианты (по меньшей мере те, что содержат пептидные связи между

аминокислотными остатками) могут быть синтезированы Fmoc-полиамидным способом твердофазного синтеза пептидов, как раскрыто у Lukas и соавторов (Solid-phase peptide synthesis under continuous-flow conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May 1981; 78(5): 2791–2795) 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 глютаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты), бутилоксикарбонильное производное (в случае лизина и гистидина), тритильное производное (в случае цистеина) и производное 4-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфонила (в случае аргинина). Если глютамин или аспарагин являются C-терминальными остатками, для защиты амидогруппы боковой цепи используется 4,4'-диметоксибензгидрильная группа. Твердофазный носитель основан на полимере полидиметилакриламиде, состоящем из трех мономеров: диметилакриламида (каркасный мономер), бис-акрилоилэтилендиамина (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-гидроксиметилфеноксиуксусной кислоты. Все аминокислотные производные добавляются в виде их предварительно синтезированных производных симметричных ангидридов, за исключением аспарагина и глютамина, которые добавляются с применением обратной реакции соединения, опосредованной N, N-дициклогексилкарбодиимид/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 T, et al. From production of peptides in milligram amounts for research to multi-tons quantities for drugs of the future. *Curr Pharm Biotechnol.* 2004 Feb;5(1):29-43. Review 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 (UK) Ltd, Ноттингем, NG7 2QJ, 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.

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

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

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

Желательный способ модификации ДНК, кодирующей полипептид по изобретению, – это использование полимеразной цепной, как раскрыто в работе Saiki RK, et al. (Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. N Engl J Med. 1988 Sep 1;319(9):537-41). Этот метод 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 по 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 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 СНО, имеющимися в наличии в Американской коллекции типовых культур ATCC.

Типичная клеточная векторная плаزمида млекопитающих для конститутивной экспрессии включает промотор CMV или SV40 с подходящим концевым участком поли-А и маркером устойчивости, таким как неомицин. Одним примером является pSVL, имеющимся в наличии в компании Pharmacia, Пискатеуэй, Нью-Джерси, США. Примером индуцируемого вектора экспрессии млекопитающих является pMSG, также имеющийся в наличии в Pharmacia. Пригодными плазмидными векторами дрожжей являются pRS403-406 и pRS413-416, и они, как правило, имеются в наличии у компании Stratagene Cloning Systems, Ла Джолла, Калифорния 92037, США. Плазмиды pRS403, pRS404, pRS405 и pRS406 являются дрожжевыми интегрирующими плазмидами (YIps) 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, цитоплазмическую экспрессию или секрецию и N-терминальную или C-терминальную маркировку в различных комбинациях FLAG, 3xFLAG, *c-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, hGH polyA, и точку начала репликации fl. 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.

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* штамм DH5, имеющимся в наличии в Bethesda Research Laboratories Inc., Бетесда, Мэриленд, США, и RR1, имеющимся в наличии в Американской коллекции типовых культур ("American Type Culture Collection" (ATCC), Роквил, Мэриленд, США (№ ATCC 31343). Предпочтительные эукариотические клетки-хозяева включают дрожжи, клетки насекомых и млекопитающих, предпочтительно клетки позвоночных, таких как мышь, крыса, обезьяна или человеческие фибробластные клетки и клеточные линии толстого кишечника. Дрожжевые клетки-хозяева включают YPH499, YPH500 и YPH501, которые, как правило, имеются в наличии в Stratagene Cloning Systems, Ла Джола, 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 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. (1972) Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 69, 2110 и Sambrook и соавт. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Нью-Йорк. Трансформация дрожжевых клеток описывается в работе Sherman и соавт. (1986) *Methods In Yeast Genetics, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Нью-Йорк. Также подходит метод Бигса (Beggs) (1978) *Nature* 275,104-109. Что касается клеток позвоночных, то подходящие для трансфекции таких клеток реагенты, например, фосфат кальция и 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 выявляться 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 по изобретением.

В предпочтительном варианте осуществления клетка-хозяин является антигенпрезентирующей клеткой, в частности, дендритной клеткой или антигенпрезентирующей клеткой. АПК, нагруженные рекомбинантным белком слияния, содержащим простатическую кислотную фосфатазу (PAP), были одобрены Управлением по контролю за продуктами питания и лекарственными средствами США (FDA) 29 апреля 2010 г. для применения при лечении метастатического HRPC (гормон-рефрактерного рака предстательной железы), протекающего бессимптомно или с минимально выраженными симптомами (Sipuleucel-T) (Small EJ, Schellhammer PF, Higano CS,

Redfern CH, Nemunaitis JJ, Valone FH, Verjee SS, Jones LA, Hershberg RM.; Placebo-controlled phase 3 trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer; J Clin Oncol. 2006; 24(1):308924; Rini BI, Weinberg V, Fong L, Conry S, Hershberg RM, Small EJ; Combination immunotherapy with prostatic acid phosphatase pulsed antigen-presenting cells (Provenge) plus bevacizumab in patients with serologic progression of prostate cancer after definitive local therapy; Cancer. 2006; 107(1):67-74)

В другом аспекте изобретения предложен затем 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. Вводиться 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., Nature Medicine 18, 1254–1261 (2012)).

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 по изобретением. Предпочтительно, если с антигенпрезентирующей клеткой применяется достаточное количество антигена.

Предпочтительно, если в клетке млекопитающих не имеется пептидного транспортера ТАР или имеется его пониженный уровень или пониженная функциональная активность.

Подходящие клетки с дефицитом пептидного транспортера TAP, включают T2, RMA-S и клетки дрозиды. 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 ATCC, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, США, под каталожным номером CRL 1992; клеточная линия дрозиды, линия Schneider 2 имеется в наличии в ATCC под каталожным номером CRL 19863; клеточная линия мыши RMA-S описывается в работе Karre и соавт. 1985 (Ljunggren, H.-G., and K. Karre. 1985. J. Exp. Med. 162:1745).

Предпочтительно, если указанная клетка-хозяин до трансфекции, 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 ЦТЛ.

Если антигенпрезентирующая клетка трансфицирована для экспрессии такого эпитопа, то предпочтительно, чтобы клетка включала вектор экспрессии, способный экспрессировать пептид, содержащий последовательности с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 325, SEQ ID NO: 326 по SEQ ID NO: 447 или с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 605, или вариант такой аминокислотной последовательности, как описывается в настоящем документе.

Для получения ЦТЛ *in vitro* могут быть использованы многие другие способы. Например, для получения ЦТЛ используются аутологичные опухоль-инфильтрующие лимфоциты. Plebanski и соавт. (1995) (Induction of peptide-specific primary cytotoxic T lymphocyte responses from human peripheral blood. Eur J Immunol. 1995 Jun;25(6):1783-7) для получения ЦТЛ используют аутологичные лимфоциты периферической крови (ЛПК) Кроме того, возможно получение аутологичных ЦТЛ посредством нагрузки дендритных клеток пептидом или полипептидом или посредством инфицирования рекомбинантным

вирусом. Для получения аутологичных ЦТЛ также можно использовать В-клетки. Кроме того, для получения аутологичных ЦТЛ могут быть использованы макрофаги, нагруженные пептидом или полипептидом или инфицированные рекомбинантным вирусом. S. Walter и соавторы 2003 (Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T-cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres. J Immunol. 2003 Nov 15; 171 (10):4974-8) описывают прайминг Т-клеток *in vitro* с использованием искусственных антигенпрезентирующих клеток (иАПК), который является также подходящим способом генерирования 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 коstimуляторной 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 (СНО), бакуловирус-инфицированные клетки насекомых, бактерии, дрожжи, инфицированные осповакциной клетки-мишени. Кроме того, могут быть использованы растительные вирусы (см., например, работу Porta и соавт. (1994) Development of cowpea mosaic virus as a high-yielding system for the presentation of foreign peptides. Virology. 1994 Aug 1;202(2):949-55), 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: 325, SEQ ID NO: 326 по SEQ ID NO: 447 или с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 605.

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 по 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» изобретатели подразумевают также, что полипептид экспрессирован в избытке по сравнению с нормальными уровнями экспрессии, или что ген является «молчащим» в ткани, из которой образовалась опухоль,

однако он экспрессирован в опухоли. Под понятием «экспрессирован в избытке» изобретатели 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 Gattinoni L, et al. Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. Nat Rev Immunol. 2006 May;6(5):383-93. Review. И Morgan RA, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. Science. 2006 Oct 6;314(5796):126-9).

Любая молекула по изобретению, т. е. пептид, нуклеиновая кислота, антитело, вектор экспрессии, клетка, активированный ЦТЛ, 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 лекарственного средства или в производстве лекарственного средства. Молекула может быть использована сама по себе или в комбинации с другой(ими) молекулой(ами) по изобретению или известной(ыми) молекулой(ами).

Предпочтительно, если лекарственное средство по настоящему изобретению является вакциной. 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. Пептиды могут быть также конъюгированы с подходящим носителем, таким как гемоцианин фиссуреллы (KLH) или маннан (см. патентную заявку WO 95/18145 и Longenecker, 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⁺ ЦТЛ более эффективна в присутствии поддержки, предоставляемой CD4 хелперными Т-клетками. Таким образом, для эпитопов МНС I класса, которые стимулируют CD8⁺ ЦТЛ, 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: 605, и по меньшей мере один дополнительный пептид, предпочтительно от двух до 50, более предпочтительно от двух до 25, еще более предпочтительно от двух до 20 и, наиболее предпочтительно, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать или восемнадцать пептидов. Пептид(ы) может(могут) быть получен(ы) из одного или более специфических ТАА и может(могут) связываться с молекулами МНС I класса.

В другом аспекте вакцина включает по меньшей мере один пептид, имеющий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 325, SEQ ID NO: 326 по SEQ ID NO: 447 или с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 605, и по меньшей мере один дополнительный пептид, предпочтительно от двух до 50, более предпочтительно от двух до 25, еще более предпочтительно от двух до 20 и, наиболее предпочтительно, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать или восемнадцать пептидов. Пептид(ы) может(могут) быть получен(ы) из одного или более специфических ТАА и может(могут) связываться с молекулами МНС I класса.

Полинуклеотид 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 (Pascolo et al., 2005 Human peripheral blood mononuclear cells transfected with messenger RNA stimulate antigen-specific cytotoxic T-lymphocytes in vitro. Cell Mol Life Sci. 2005 Aug;62(15):1755-62). 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.

Лекарственное средство по изобретению может также включать один или более адъювантов. Адъюванты – это вещества, которые неспецифически усиливают или потенцируют иммунный ответ (например, иммунные ответы, опосредованные ЦТЛ или хелперными Т-клетками (Т_H) на антиген, и могут, таким образом, рассматриваться как полезные в лекарственном средстве 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-ККФ, IC30, IC31, имиквимод (ALDARA[®]), резимиквимод, ImuFact IMP321, интерлейкины, такие как ИЛ-2, ИЛ-13, ИЛ-21, интерферон-альфа или бета или их пегилированные производные, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, иммуностимулирующие комплексы ISCOM, JuvImmune[®], LipoVac, MALP2, MF59, монофосфорил липид А, Монтанид IMS 1312, Монтанид ISA 206, Монтанид ISA 50V, Монтанид ISA-51, эмульсии «вода в масле» и «масло в воде», ОК-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, векторная система PepTel[®], основанные на полилактид-ко-гликолиде [PLG] и декстране микрочастицы, талактоферрин SRL172,

вирсомы 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 The Yin and Yang of T cell costimulation. Science. 1995 Nov 10;270(5238):932-3. Review). 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, IFN-альфа, IFN-бета) (Gabrilovich, 1996 Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells Nat Med. 1996 Oct;2(10):1096-103).

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 T_H1 -клеток и интенсивной выработке цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) даже при отсутствии помощи CD4 Т-клеток. Активация T_H1 , вызванная стимуляцией TLR9, сохраняется даже в присутствии вакцинных адъювантов, таких как квасцы или неполный адъювант Фрейнда (IFA), которые обычно способствуют активации T_H2 . 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 в некоторых экспериментах (Krieg, 2006). В патенте США № 6 406 705 B1 описывается комбинированное применение CpG-олигонуклеотидов, адъювантов, не включающих нуклеиновые кислоты, и антигена для вызывания антиген-специфического иммунного ответа. Антагонистом CpG TLR9 является dSLIM (иммуномодулятор со структурой типа двуцепочечный стебель-петля) компании Mologen (Берлин, Германия), который является предпочтительным компонентом фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Также могут быть использованы другие молекулы, связывающиеся с TLR, такие как TLR 7, TLR 8 и/или TLR 9, связывающиеся с РНК.

Другие примеры пригодных к использованию адъювантов включают, но без ограничения, химически модифицированные CpG (например, CpR, Idera), аналоги 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 TNFальфа) 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 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 по изобретению 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 по изобретению 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 по изобретению адъювантом является циклофосфамид, имиквимод или резиквимод.

Еще более предпочтительными адъювантами являются монтанид IMS 1312, монтанид ISA 206, монтанид ISA 50V, монтанид ISA-51, поли-ICLC (Hiltonol®) и моноклональные антитела к CD40 или их комбинации.

Эта композиция используется для парентерального введения, такого как подкожное, внутривенное, внутримышечное или для перорального введения. Для этого пептиды и – факультативно – другие молекулы растворяют или суспендируют в фармацевтически приемлемом, предпочтительно водном, носителе. Помимо того, композиция может содержать вспомогательные вещества, такие как буферы, связующие агенты, балластные вещества, разбавители, ароматизаторы, смазочные вещества и т.д. Пептиды могут быть также введены совместно с иммуностимулирующими веществами, такими как цитокины. Обширный список вспомогательных веществ, которые могут быть использованы в такой композиции, можно найти, например, в работе A. Kibbe, «Handbook of Pharmaceutical Excipients», 3rd Ed., 2000, изд. «American Pharmaceutical Association and pharmaceutical press». Композиция может использоваться для предупреждения, профилактики и/или лечения аденоматозных или раковых заболеваний. Примеры составов могут быть взяты, например, из EP2113253.

Тем не менее, в зависимости от количества физико-химических свойств пептидов по изобретению необходимо проведение дальнейших исследований, чтобы предложить

составы конкретных комбинаций пептидов, в особенности комбинации из более чем 20 пептидов, которые были бы стабильны в течение свыше 12 – 18 месяцев.

В настоящем изобретении предложено лекарственное средство, которое полезно в лечении рака, в частности, ОМЛ, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ) и других злокачественных гематологических заболеваний.

В настоящем изобретении также предложен набор, 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 раствора и/или по применению лиофилизированного состава.

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

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

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

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

Комплекты по настоящему изобретению могут включать один контейнер, который содержит лекарственную форму фармацевтических композиций по настоящему 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, в/к. Введение может производиться инфузионным насосом.

Так как пептиды по изобретению были выделены из опухолевой ткани, относящейся к ОМЛ, лекарственное средство по изобретению предпочтительно используется для лечения ОМЛ. В предпочтительном варианте осуществления пептиды по изобретению, полученные из клеток ABCA13 и MMP12, были выделены из клеток ОМЛ, лекарственное средство по изобретению предпочтительно используется для лечения ОМЛ, клетками которого избыточно экспрессируются эти полипептиды.

Кроме того, настоящее изобретение включает способ получения персонализированного фармацевтического препарата для отдельного пациента, включающий производство фармацевтической композиции, включающей по меньшей мере один пептид, выбранный из хранилища (банка данных) предварительно прошедших скрининг пептидов TUMAP, где по меньшей мере один пептид, используемый в фармацевтической композиции, выбран по его пригодности для отдельного пациента. Предпочтительно, если фармацевтическая композиция является вакциной. Способ может быть адаптирован для получения Т-клеточных клонов для дальнейшего применения, например, при выделении ТКР.

«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 пептидов, которые предварительно прошли скрининг на иммуногенность и избыточную презентацию в конкретном виде опухоли, например, в форме банка данных или фактически используемой единицы хранения. Понятие «хранилище» не подразумевает, что конкретные пептиды, включенные в вакцину, были изготовлены заблаговременно и хранились в реальном помещении, хотя эта возможность также принимается во внимание. Во внимание определенно принимается тот факт, что пептиды могут быть изготовлены *de novo* для каждой производимой индивидуализированной вакцины, или могут быть получены заранее и находиться на хранении.

Хранилище (например, в форме банка данных или фактически используемой единицы хранения) состоит из опухолеассоциированных пептидов, которые в высокой степени избыточно экспрессировались опухолевой тканью нескольких HLA-A, HLA-B и HLA-C-положительных проанализированных пациентов с ОМЛ (см. таблицы 1–3). Оно содержит пептиды, связанные с молекулами МНС I класса и МНС II класса. Помимо опухолеассоциированных пептидов, собранных из нескольких тканей мультиформной глиобластомы, хранилище может содержать маркерные пептиды, связанные с HLA-A*02 и HLA-A*24. Эти пептиды позволяют произвести количественное сравнение интенсивности Т-клеточного иммунного ответа, индуцированного пептидами TUMAP, и, следовательно, позволяют сделать важный вывод о способности вакцины вызывать противоопухолевые ответы. Во-вторых, оно выполняет функцию важного пептида положительного контроля, полученного «не из собственного» антигена в случае, если у пациента не наблюдаются вызванные Т-клеточные ответы на пептиды TUMAP, полученные из «собственных» антигенов. И в-третьих, оно может позволить сделать заключения относительно статуса иммунокомпетентности популяции пациентов.

Пептиды TUMAP HLA I и II классов для хранилища (например, в форме банка данных или фактически используемой единицы хранения) были идентифицированы с помощью

интегрированного подхода функциональной геномики, комбинирующего анализ экспрессии генов, массовую спектрометрию и Т-клеточную иммунологию. 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 отбора пептидов образцы ОМЛ 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 (ОМЛ) по сравнению с рядом нормальных органов и тканей применяли анализ экспрессии информационной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) всего генома с помощью микрочипов.
3. Идентифицированные HLA-лиганды сравнивали с данными по экспрессии генов. Пептиды, 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. Для оценки того, может ли быть обоснована 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 ОМЛ.

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, определяли способом, включающим прайминг Т-клеток *in vitro* посредством повторных стимуляций CD8+ Т-клеток здоровых доноров искусственными антигенпрезентирующими клетками, 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 с помощью вакцины. Выбранные отдельные пептиды или комбинации из нескольких «готовых к применению» пептидов будут использоваться для каждого пациента в рамках мультитаргетного подхода. Теоретически, подход, основанный на выборе, например, 5 различных антигенных пептидов из библиотеки из 50 экземпляров, уже приведет приблизительно к 17 миллионам возможных составов лекарственного препарата (ЛП).

В одном аспекте для включения в вакцину пептиды выбирают по их пригодности для отдельного пациента на основе способа по настоящему изобретением, как уже описано в настоящем документе и как изложено ниже.

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

Предпочтительно, чтобы пептиды, включенные в вакцину, были идентифицированы способом, включающим: (а) идентификацию опухолеассоциированных пептидов (TUMAP), презентруемых опухолевым образцом отдельного пациента; (б) сравнение идентифицированных на этапе (а) пептидов с хранилищем (банком данных) пептидов, как описано выше; и (в) выбор по меньшей мере одного пептида из хранилища (банка данных), который коррелирует с опухолеассоциированным пептидом, идентифицированным у пациента. Например, пептиды TUMAP, презентруемые опухолевым образцом, идентифицируют с помощью: (a1) сравнения данных по экспрессии в опухолевом образце с данными нормальной ткани, соответствующей типу ткани опухолевого образца, для идентификации белков, которые в опухолевом образце экспрессируются в избытке или 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 аберрантно 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 хранилища 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 аберрантно; 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 аберрантно 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 (МКПК). 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 МКПК и устанавливают приоритетность. Идентифицированные *de novo* пептиды могут быть затем испытаны на иммуногенность, как описывается выше в случае хранилища (банка данных), 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 (банком данных) 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 (банка данных), 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), презентруемых 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 пептиды выбраны, производят вакцину.

Вакцина – это предпочтительно жидкая лекарственная форма, состоящая из отдельных пептидов, растворенных в 33% ДМСО.

Каждый пептид, включаемый в продукт, растворяют в ДМСО. Концентрация отдельных пептидных растворов должна выбираться в зависимости от числа пептидов,

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

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

Теперь настоящее изобретение будет описано с помощью последующих примеров со ссылкой на сопровождающие рисунки, которые описывают его предпочтительные воплощения, тем не менее, не ограничивая ими изобретение. По целями настоящего изобретения все цитируемые источники включены в данное описание во всей полноте путем ссылки.

Краткое описание рисунков

На **Фигуре 1** показана экспрессия HLA на поверхности клеток образцов первичного ОМЛ и гемопоэтических стволовых клеток здорового донора. Количественное определение производили *ex vivo* с помощью набора QIFIKIT (Dako). (a) Экспрессия HLA I класса (моноклон. антитела W6/32) на CD34⁺ бластных клетках ОМЛ в сравнении с аутологичными нормальными CD15⁺ моноцитами. (b) Экспрессия HLA-DR (моноклон. антитела L243) на CD34⁺ бластных клетках ОМЛ в сравнении с аутологичными нормальными CD15⁺ моноцитами. (c) Экспрессия HLA I класса (моноклон. антитела W6/32) на CD34⁺ бластных клетках ОМЛ (n=5) и CD34⁺CD38⁻ гемопоэтических стволовых клетках (n=5), полученных у здоровых доноров. (d) Экспрессия HLA-DR (моноклон. антитела L243) на CD34⁺ бластных клетках ОМЛ (n=5) и CD34⁺CD38⁻ гемопоэтических стволовых клетках (n=5), полученных у здоровых доноров. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$, непарный *t*-критерий. Сокращения: UPN, унифицированный номер пациента

На **Фигуре 2** показано число HLA-лигандов и исходных белков, идентифицированных из образцов первичного ОМЛ. Уникальные номера ID (пептидные последовательности и соответствующие исходные белки), идентифицированные с помощью ЖХ-МС/МС для HLA I класса (моноклон. антитела W6/32, n=15) и HLA II класса (моноклон. антитела Tü39, n=12) на образцах первичного ОМЛ. В данное исследование включали идентификации уникальных лигандов только для таких образцов, которые выполняли требование по пороговому уровню: ≥ 500 (HLA I класса) и ≥ 100 (HLA II класса). Сокращения: ID, идентификация; UPN, унифицированный номер пациента

На **Фигуре 3** показана идентификация мишеней для пептидной вакцинации на основе характеристики лигандома HLA I класса/ исходного протеома ОМЛ (n=15), МКПК (n=30) и МККМ (n=5) (а) перекрывание исходных белков лигандов HLA I класса ОМЛ, МКПК и МККМ. (б) сравнительные профили исходных белков лигандов HLA I класса на основе частоты рестриктированной по HLA представленности в клетках ОМЛ, МКПК и МККМ. Абсолютное число пациентов/доноров, положительных для HLA-рестриктированной презентации соответствующего исходного белка (ось x), представлены на оси y. Пунктирные линии указывают на 100% представленность для каждой соответствующей когорты. Прямоугольником слева отмечена группа исходных белков, демонстрирующих ОМЛ-эксклюзивную представленность с частотой $>20\%$ (LiTAAs: опухолеассоциированные антигены, происходящие из лигандома). (с) анализ представленности опубликованных ОМЛ-ассоциированных антигенов в лигандомах HLA I класса. Столбцы показывают относительную представленность соответствующих антигенов лигандами HLA I класса в клетках ОМЛ, МКПК и МККМ. (d) Подкласс-специфический анализ лигандома HLA I класса клеток ОМЛ с мутацией FLT3-ITD (n=8) в сравнении с FLT3-WT (n=7). Анализ перекрывания ОМЛ-эксклюзивных исходных белков (как определено в (б)) для клеток ОМЛ с FLT3-ITD и с FLT3-WT. (е) сравнительные профили ОМЛ-эксклюзивных исходных белков лиганда HLA I класса на основе частоты рестриктированной по HLA представленности в клетках ОМЛ с FLT3-ITD и с FLT3-WT. Прямоугольник посередине представляет собой группу общих исходных белков, который включает 91,3% определенных в настоящем описании LiTAA.

На **Фигуре 4** представлены функциональные характеристики пептидов LiTAP, связанных с молекулами HLA I класса, в образцах ОМЛ. (а) анализ методом IFN- γ ELISPOT МКПК пациента с ОМЛ после стимуляции 2 различными рестриктированными по A*03 пулами связанных с ОМЛ пептидов LiTAP (опухолеассоциированный пептид, образованный из лиганда) (P^I_1 и P^I_2). Фитогемагглютинин (ФГА) служил в качестве положительного контроля, стимуляция пептидом ВИЧ GAG₁₈₋₂₆ A*03 – в качестве отрицательного контроля. Для пулов P^I_1 и P^I_2 наблюдалась значимая выработка IFN- γ . (b) внутриклеточное окрашивание IFN- γ и TNF- α пулов P^I_1 и P^I_2 стимулированных МКПК пациента с ОМЛ (то же самое, что и в (а)). ФМА/иономицин служил в качестве положительного контроля, пептид ВИЧ GAG₁₈₋₂₆ A*03 – в качестве отрицательного контроля. (с) перекрестный анализ методом IFN- γ ELISPOT МКПК здорового донора после стимуляции рестриктированными по A*03 пептидами LiTAP из связанных с ОМЛ пулов P^I_1 и P^I_2 , не показали значимой выработки IFN- γ .

На **Фигуре 5** показана идентификация дополнительных/синергических мишеней пептидных вакцин на основе характеристик лиганда HLA II класса образцов ОМЛ. (а) анализ перекрывания исходных протеомов лигандов HLA II класса ОМЛ (n=12), МКПК (n=13) и МКК (n=2). (b) сравнительные профили исходных белков лиганда HLA II класса на основе частоты рестриктированной по HLA представленности в клетках ОМЛ, МКПК и МККМ. Абсолютное число пациентов/доноров, положительных для HLA-рестриктированной представленности соответствующего исходного белка (ось x), представлены на оси y. Пунктирные линии указывают на 100% представленность для каждой соответствующей когорты. Прямоугольником слева отмечена группа исходных белков, демонстрирующих ОМЛ-эксклюзивную представленность с частотой >20%. (с) анализ перекрывания ОМЛ-эксклюзивных исходных белков HLA I класса и HLA II класса. (d) из 43 общих ОМЛ-эксклюзивных исходных белков была идентифицирована группа из 3, содержащая целостные лиганды HLA I класса, встроенные в пептиды, связывающиеся с молекулами HLA II класса. Встроенные последовательности отмечены жирным шрифтом. (е) анализ методом IFN- γ ELISPOT МКПК пациентов с ОМЛ после стимуляции различными пептидами LiTAP образцов ОМЛ, презентующихся молекулами HLA II класса (P^{II}_1 , P^{II}_2 и P^{II}_3). Фитогемагглютинин (ФГА) служил в качестве положительного контроля, стимуляция пептидом FLNA₁₆₆₉₋₁₆₈₃ HLA-DR – в качестве отрицательного контроля. Для пептидов P^{II}_1 , P^{II}_2 и P^{II}_3 у многих пациентов

наблюдалось значимое повышение выработки IFN- γ . Сокращения: UPN, унифицированный номер пациента.

На **Фигуре 6** представлены результаты одного эксперимента для оценки внутренней гетерогенности лигандомов HLA I класса в группе FLT3-ITD (n=8) по сравнению с группой FLT3-WT (n=7). Заявители провели полуколичественную индексацию сходства. В целях сравнения лигандомов различных видов HLA заявители провели анализ на уровне исходных белков-HLA-лигандов. Полуколичественные характеристики были получены из анализа спектральных отсчетов (PSM, сопоставления пептидных спектров) презентуемых HLA-лигандов. Евклидовы расстояния были проанализированы в качестве меры для установления сходства/различия для пары образцов, причем низкие значения указывают на высокое сходство, а высокие значения указывают на высокое различие. Евклидовы расстояния были подсчитаны для каждой возможной пары образцов для каждой группы с использованием внутрилабораторного программного обеспечения Python script (Python v3.3.3, Python Software Foundation). Вкратце, суммарные значения PSM в каждой паре образцов были нормализованы до соответствующего образца с более высоким значением. Списки исходных белков были объединены, и абсолютные значения различий в подсчетах PSM, представляющих соответствующие исходные белки, были суммированы для получения Евклидова расстояния. *** $P < 0,001$, непарный t -критерий.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1:

Идентификация и количественное определение опухолеассоциированных пептидов, презентуемых на поверхности клетки

Образцы тканей

Опухолевые образцы пациентов были предоставлены Университетом г. Тюбинген, Германия. Было получено информированное согласие всех пациентов в письменной форме. Сразу же после операции образцы были подвергнуты шоковой заморозке в жидком азоте и хранились до выделения TUMAP-пептидов при -80°C . Для анализа лиганда методом центрифугирования в градиенте плотности были выделены МКПК

пациентов с ОМЛ в момент постановки диагноза или рецидива до начала лечения (>80% бластных клеток ОМЛ в крови), а также МКПК и МККМ здоровых доноров.

Выделение пептидов HLA из образцов тканей

Молекулы HLA I и II классов выделяли с использованием метода стандартной иммуноаффинной очистки, как было описано ранее. Вкратце, мгновенно замороженный клеточный осадок лизировали в 10 мМ CHAPS/PBS (AppliChem, Сент-Луис, Миссури, США/Gibco, Карлсбад, Калифорния, США), содержащем 1х ингибитора протеазы (Complete, Roche, Базель, Швейцария). Молекулы HLA прошли одноэтапную очистку с использованием универсальных моноклональных антител, специфичных к HLA I класса W6/32, специфичных к HLA II класса Tü39, соответственно, ковалентно связанных с CNBr-активированной сефарозой (GE Healthcare, Чалфонт Сент Джайлс, Великобритания). Комплексы HLA-пептид были элюированы посредством повторного добавления 0,2% трифторуксусной кислоты (TFA, Merck, Уайтхауз Стейшн, Нью-Джерси, США). Элюированные фракции E1-E8 были объединены, и свободные HLA-лиганды были выделены с помощью ультрафильтрации с использованием фильтрационных единиц центрифуг (Amicon, Millipore, Биллерика, Массачусетс, США). HLA-лиганды экстрагировали и обессоливали из фильтрата с использованием наконечников для пипеток ZipTip C18 (Millipore). Экстрагированные пептиды элюировали в 35 мкл 80% ацетонитрила (АЦН, Merck)/0,2% ТФУ, центрифугировали до полностью сухого состояния и ресуспендировали в 25 мкл 1% АЦН/0,05% ТФУ. Образцы хранили при -20 °С до проведения анализа с помощью ЖХ-МС/МС.

Анализ HLA-лигандов с помощью ЖХ-МС/МС

Пептидные образцы разделяли обращено-фазовой жидкостной хроматографией (nanoUHPLC, UltiMate 3000 RSLCnano, ThermoFisher, Уолтем, Массачусетс, США) и затем анализировали на гибридном масс-спектрометре LTQ Orbitrap XL (ThermoFisher) в онлайн-режиме. Образцы анализировали в 5 технических повторах. Объемы образцов 5 мкл (аликвоты по 20%) впрыскивали на улавливающую колонку 75 мкм x 2 см (Acclaim PepMap RSLC, ThermoFisher) при скорости 4 мкл/мин в течение 5,75 минут. Затем разделение пептидов проводили при 50°C и скорости потока 175 нл/мин на разделительной колонке 50 мкм x 50 см (Acclaim PepMap RSLC, ThermoFisher) с применением градиента в диапазоне от 2,4 до 32,0% АЦН на протяжении 140 минут. Элюированные пептиды ионизировали методом ионизации на основе наноспрея и

анализировали на масс-спектрометре с применением метода «top 5 CID» (диссоциация, индуцированная столкновением), генерирующего спектры фрагментов для 5 наиболее распространенных ионов-предшественников в обзорных сканах. Разрешение было установлено на уровне 60 000. Для лигандов HLA I класса диапазон масс был ограничен до 400-650 m/z при состояниях заряда 2 и 3, разрешенных для фрагментации. Для HLA II класса диапазон масс 300-1500 m/z анализировали при состоянии заряда ≥ 2 , разрешенного для фрагментации.

Профили презентации отдельных пептидов, презентуемых в избытке, показаны на Фигуре 3.

Амплификация пептид-специфических Т-клеток

МКПК пациентов с ОМЛ и здоровых доноров культивировали в среде RPMI1640 (Gibco) с добавлением 10% объединенной человеческой сыворотки (PHS, собственного производства), 100 мМ β -меркаптоэтанола (Roth, Карлсруэ, Германия) и 1% пенициллина/стрептомицина (GE). Для стимуляции CD8⁺ Т-клеток МКПК размораживали и нагружали 1 мкг/мл каждого пептида. Нагруженные пептидом МКПК ($5-6 \times 10^6$ клеток/мл) культивировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 12 дней. В день 0 и день 1 в культуральную среду добавляли 5 нг/мл ИЛ-4 (R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота, США) и 5 нг/мл ИЛ-7 (Promokine, Гейдельберг, Германия). В дни 3, 5, 7 и 9 в культуральную среду добавляли 2 нг/мл ИЛ-2 (R&D Systems). Стимулированные пептидом МКПК были функционально охарактеризованы с помощью анализа ELISPOT в день 12 и с помощью внутриклеточного окрашивания цитокинов в день 13, соответственно. В целях стимуляции Т-клеток CD4⁺ их культивировали как описано для CD8⁺ Т-клеток с 2 модификациями: нагружение осуществлялась 10 мкг/мл пептида, связывающегося с молекулами HLA II класса, а ИЛ-4 и ИЛ-7 не добавляли.

Анализ IFN- γ ELISPOT

Анализ IFN- γ ELISPOT осуществляли, как было описано ранее (Widenmeyer M, Griesemann H, Stevanovic S, Feyerabend S, Klein R, Attig S, et al. Promiscuous survivin peptide induces robust CD4⁺ T-cell responses in the majority of vaccinated cancer patients. *Int J Cancer*. 2012 Jul 1;131(1):140-9). Вкратце, в 96-луночные планшеты из нитроцеллюлозы (Millipore) вносили 1 мг/мл IFN- γ моноклонального антитела (Mabtech, Цинциннати, Огайо, США) и инкубировали в течение ночи при 4 °C. Планшеты блокировали 10% PHS

в течение 2 ч при 37 °C. В 5×10^5 клеток/лунку предварительно простимулированных МКПК вводили 1 мкг/мл (HLA I класса) или 2,5 мкг/мл (HLA II класса) пептида и инкубировали в течение 24-26 ч. Считывание проводили согласно инструкциям производителя. Пятна подсчитывали с помощью анализатора ImmunoSpot S5 (CTL, Шейкер Хайтс, штат Огайо, США). Ответы Т-клеток рассматривали как положительные, если было посчитано >15 пятен/лунку, и среднее число подсчитанных пятен на лунку было по меньшей мере в 3 раза выше, чем среднее число пятен в лунках отрицательного контроля (по рекомендациями иммунной программы Ассоциации иммунотерапии рака (CIP)).

Внутриклеточное окрашивание IFN- γ и TNF- α

Частоту и функции пептид-специфических CD8⁺ Т-клеток анализировали методом внутриклеточного окрашивания IFN- γ и TNF- α . В МКПК вводили 1 мкг/мл отдельного пептида и инкубировали в присутствии 10 мкг/мл Брефелдина А (Sigma, Сент-Луис, Миссури, США) и 10 мкг/мл GolgiStop (BD) в течение 6-8 ч. Клетки помечали с использованием Cytofix/Cytoperm (BD), CD8-PECy7 (Beckman Coulter, Фуллертон, Калифорния, США), CD4-APC (BD Bioscience), TNF- α -PE (Beckman Coulter) и IFN- γ -FITC (BD). Образцы анализировали на цитофлуориметре FACS Canto II.

Количественное определение экспрессии HLA на поверхности клеток

Чтобы провести сравнение со здоровыми моноцитами, проводили количественное определение экспрессии HLA на клеточной поверхности в дополнительных образцах ткани пациентов, содержащих бластные клетки ОМЛ CD15⁻ и по меньшей мере 5% нормальных моноцитов CD15⁺, как было определено иммунофенотипированием. Экспрессию HLA на клеточной поверхности анализировали при использовании набора для количественного определения методом проточной цитометрии QIFIKIT® (Dako, Глоструп, Дания) по инструкциями производителя. Вкратце, для каждого из образцов проводили тройное параллельное окрашивание специфичными к HLA I класса универсальными моноклональными антителами W6/32, специфичными к HLA-DR-моноклональными антителами L243 (оба собственного производства) или изотипом IgG в качестве контроля (BioLegend, Сан-Диего, Калифорния, США), соответственно. Затем проводили вторичное окрашивание FITC-конъюгированными фрагментами (Dako) кроличьих антимышиных антител F(ab')₂ на МКПК, МККМ, а также гранулах для количественного определения QIFIKIT®. Окрашивание поверхностных маркеров

проводили напрямую мечеными CD34 (BD, Френклин Лейкс, Нью-Джерси, США), CD15 (BD), CD45 (BD) и CD38 (BD). 7AAD (BioLegend) добавляли в качестве маркера жизнеспособности непосредственно перед анализом методом проточной цитометрии на цитометрическом анализаторе LSR Fortessa (BD).

Результаты

На пробах ткани первичного ОМЛ не наблюдается потеря или снижение уровня экспрессии HLA по сравнению с аутологичными нормальными лейкоцитами

Определяли уровни экспрессии на бластных клетках ОМЛ по сравнению с соответствующими нормальными лейкоцитами. Для этого проводили количественное определение поверхностных уровней HLA для панели из 5 пациентов с ОМЛ CD15⁻ и 5 здоровых доноров МККМ с помощью проточной цитометрии. Из бластных клеток ОМЛ путем гейтирования выделяли CD34⁺, CD45^{med} жизнеспособные клетки, и их экспрессию HLA сравнивали с аутологичными CD15⁺ нормальными гранулоцитами и моноцитами. Было установлено, что уровни HLA заметно различались с общим количеством молекул HLA I класса в диапазоне от 45 189-261 647 молекул/клетку на бластных клетках ОМЛ и 75 344-239 496 молекул/клетку на клетках CD15⁺. Анализ поверхностной клеточной экспрессии HLA у отдельных пациентов методом трех параллельных измерений выявил небольшую, хотя значимую избыточную экспрессию у 3 из 5 пациентов (непарный *t*-критерий, $P \leq 0,001$). Уровень экспрессии HLA-DR находился в диапазоне от 1476-45 150 молекул/клетку на бластных клетках ОМЛ и 0-3252 на клетках CD15⁺ и был значительно выше на бластных клетках ОМЛ у всех проанализированных пациентов ($P \leq 0,001$). Для сравнения проводили анализ количества молекул HLA на поверхности гемопоэтических стволовых клеток (HSC, CD34⁺CD38⁻) 5 здоровых доноров МККМ. Всеобъемлющий статистический анализ экспрессии HLA на поверхности клеток ОМЛ по сравнению с нормальными моноцитами не выявил значимых различий среднего уровня экспрессии HLA I и II класса. Было установлено, что средний уровень молекул HLA I класса на нормальных гемопоэтических стволовых клетках (ГСК) (248 587±35 351 молекул/клетку) был значительно выше, чем на бластных клетках ОМЛ (116 445±37 855 молекул/клетку, $P=0,034$, Фиг. 1с). Средний уровень молекул HLA II класса на нормальных гемопоэтических стволовых клетках (ГСК) (38 373±5 159 молекул/клетку) не был значительно выше по сравнению с бластными клетками ОМЛ (17 103±7 604 молекул/клетку, $P=0,053$).

Метод ЖХ-МС/МС позволяет выявить обширный ряд естественно презентуемых лигандов HLA I и II класса

С помощью картирования лигандомов HLA I класса 15 пациентов с ОМЛ (Таблица 1) было идентифицировано в общей сложности 13 238 различных пептидов, представляющих 6104 исходных белков. Количество идентифицированных (раковых) уникальных пептидов на одного пациента составило 563-2733 (среднее значение: 1299 пептидов). В группе здоровых индивидов (30 доноров МКПК, 5 доноров МККМ), было идентифицировано в общей сложности 17 940 уникальных пептидов (17 322 пептидов/7207 исходных белков на МКПК; 1738 пептидов/1384 исходных белков на МККМ, дополнительно). Анализом лигандомов HLA II класса у 12 пациентов с ОМЛ выявил в общей сложности 2816 уникальных пептидов (диапазон: 104-753 пептидов/пациент, среднее значение: 332 пептида), представляющих 885 исходных белков. В контрольной группе здоровых индивидов (13 доноров МКПК, 2 донора МККМ) в комплексе с молекулами HLA II класса было выявлено 2202 различных пептида (2046 пептидов/756 исходных белков на МКПК, 317 пептидов/164 исходных белка на МККМ). Корреляции между количеством проанализированных клеток и количеством идентифицированных пептидов ни для молекул HLA I класса (коэффициент Спирмана $r=0,27$, $P=0,33$), ни для молекул HLA II класса ($r=0,31$, $P=0,33$) установлено не было.

Сравнение профилей лигандомов HLA I класса позволяет выявить множество ОМЛ-ассоциированных антигенов

Для идентификации новых мишеней для пептидных вакцин при ОМЛ, было произведено сравнительное картирование исходных белков лигандов HLA когорт ОМЛ, МКПК и МККМ. Анализ перекрытия исходных белков HLA выявил 1435 белков (23,6% картированного исходного протеома ОМЛ), которые эксклюзивно представлены в лигандах HLA пациентов с ОМЛ. Было установлено, что 75,5% (4588 белков) исходных белков HLA образцов ОМЛ являются общими с МКПК и 19,3% (1173 белков) – с МККМ. Перекрытие исходных белков HLA-лигандов МККМ с исходным протеомом МКПК составляет 89,9% (1173 белков). Из данного обширного ряда потенциальных мишеней целью заявителей было выбрать наиболее подходящих и широко применимых кандидатов для разработки готовой к применению вакцины. По этим в качестве важнейших критериев для выбора антигенов для нашей платформы мы

определили ОМЛ-эксклюзивность и высокую частоту представленности в лигандах ОМЛ. Распределение по рангу исходных белков HLA-лигандов по этим критериям привело к идентификации подгруппы из 132 белков (2,2% из исходного протеома ОМЛ), эксклюзивно представленных в $\geq 20\%$ лигандах ОМЛ. Среди данных антигенов LiTAA (опухолеассоциированные антигены, происходящие из лиганда), определенных с помощью данных двух критериев, в качестве имеющего наивысший ранг нами был выделен фактор 1 FAS-ассоциированного белка (FAF1), который был выявлен в 8 из 15 (53,3%) лигандах пациентов и был представлен 6 различными HLA-лигандами (AEQFRLEQI (SEQ ID NO: 1) (B*44), FTAEFSSRY (SEQ ID NO: 2) (A*03), HHDESVLTNVF (SEQ ID NO: 3) (B*38:01), REQDEAYRL (SEQ ID NO: 4) (B*44:25), RPYMPSRQI (SEQ ID NO: 5) (B*07), VQREYNLNF (SEQ ID NO: 6) (B*15). Обзор 15 важнейших антигенов LiTAA, которые представлены в $\geq 33\%$ лигандах ОМЛ приведен в Таблице 2. Подводя итог, наиболее часто встречающиеся 132 антигена LiTAA позволяют получить панель из 341 различного естественно презентуемого HLA-лиганда (LiTAP, опухолеассоциированные пептиды, образованные из лиганда) из более чем 25 различных ограничений по HLA, подходящих для разработки широко применимых ОМЛ-специфических пептидных вакцин. Кроме того, дальнейшие 1389 ОМЛ-эксклюзивных исходных белков с частотой встречаемости $< 20\%$, представленных 1727 различными HLA-лигандами, могут служить в качестве базы данных для более индивидуализированных подходов к разработке вакцин.

Идентификация естественно презентуемых лигандов HLA I класса, образованных из известных ОМЛ-ассоциированных антигенов

Подход по извлечению вторичной информации был сфокусирован на идентификации и присвоении ранга известным ОМЛ-ассоциированным антигенам (как обобщается в работе Anguille S, Van Tendeloo VF, Berneman ZN. Leukemia-associated antigens and their relevance to the immunotherapy of acute myeloid leukemia. Leukemia. 2012 Oct;26(10):2186-96) из набора данных о естественно презентуемых HLA-лигандах. Было идентифицировано 122 различных HLA-лиганда, представляющих 29 из этих опубликованных антигенов. Поразительно, что было обнаружено, что $> 80\%$ (24 из 29) данных антигенов представлены также на доброкачественных МКПК и/или МККМ и, таким образом, не являются ОМЛ-специфическими.

ОМЛ-эксклюзивность в отношении презентации молекулами HLA была обнаружена для FLT3 (SELKMMTQL, B*40) (SEQ ID NO: 338), PASD1 (LLGHLPAEI, C*01:02) (SEQ ID NO: 447), HOXA9 (DAADELSVGRY, A*26:01) (SEQ ID NO: 437), AURKA (REVEIQSHL, B*49:01) (SEQ ID NO: 400) и CCNA1 (LEADPFLKY, B*18:01 (SEQ ID NO: 402); EPPAVLLL, B*51:01 (SEQ ID NO: 401)). Для миелопероксидазы (МПО) было идентифицировано в общей сложности 19 различных HLA-лигандов и установлена представленность в 6 из 15 (40%) лигандомов ОМЛ и 0 из 30 лигандомов МКПК. Тем не менее, анализ нормальных МККМ показал представленность в 3 из 5 (60%) лигандах, что подчеркивает релевантность применения как МКПК, так и МККМ для идентификации мишеней. Итак, проведенный авторами изобретения анализ выявил, что большая доля известных ОМЛ-ассоциированных антигенов не выполняет требование рестриктированной по HLA представленности, эксклюзивной для опухоли.

Специфический для подгрупп ОМЛ с мутацией FLT3-ITD по сравнению с FLT3-WT анализ лигандомов HLA I класса позволяет выявить общие антигены LiTAA, несмотря на значительное различие лигандомов

Для оценки применимости новых мишеней авторов изобретения среди различных подгрупп ОМЛ была охарактеризована представленность антигенов LiTAA в подгруппах пациентов с внутренней tandemной дупликацией в гене, кодирующем FMS-подобную тирозинкиназу 3 (FLT3-ITD, n=8) и FLT3 дикого типа (FLT3-WT, n=7). Классификация по схожести лигандом HLA I класса выявила, что подгруппа FLT3-WT демонстрировала значительно более низкую внутреннюю гетерогенность (среднее значение: $916,2 \pm 70,6$, n=21), чем подгруппа FLT3-TID (среднее значение: $1687,0 \pm 156,5$, n=21, $P < 0,0001$, Фигура 6). Анализ перекрывания ОМЛ-эксклюзивных исходных белков HLA (FLT3-WT: 748 белков, FLT3-ITD: 926 белков) выявил перекрывания в 32,0% (FLT3-WT/FLT3-ITD) и 25,6% (FLT3-ITD/FLT3-WT), соответственно (Фиг. 3d). Показательно, что было обнаружено, что 42 из 46 (91,3%) антигенов LiTAA с высоким рангом представлены в обеих подгруппах (Фиг. 3e). Три исходных белка HLA-лиганда SKP1 (5/8), C16orf13 (5/8) и ERLIN1 (4/8), которые были идентифицированы эксклюзивно в подгруппе FLT3-ITD, достигли частоты представленности в $\geq 50\%$. Специфический для подгруппы FLT3-WT антиген LiTAA MUL1 был представлен в 4 из 7 (57,1%) лигандом FLT3-WT. В целом, эти данные подкрепляют разработанную стратегию для выбора мишеней по анализу лигандомов HLA по когортам, указывающей

на небольшую долю очень часто встречающихся, специфических для подгруппы мишеней.

Функциональная оценка пептидов LiTAP раскрывает иммунореактивность, ассоциированную с ОМЛ

В целях оценки иммунореактивности и специфичности предложенных пептидов HLA-A*03 LiTAP заявители проводили затем повторный (через 12 дней) анализ IFN- γ ELISPOT. МКПК, полученные от 6 пациентов с ОМЛ, а также 8 здоровых доноров стимулировали различными пулами (P^I_1 и P^I_2) пептидов LiTAP HLA-A*03 с высоким рангом. Значительная выработка IFN- γ наблюдалась в случае обоих пулов пептидов в 2 из 6 образцах ОМЛ (Фиг. 4а). В целях подтверждения этих наблюдений проводили внутриклеточное окрашивание цитокинов и проточную цитометрию для определения IFN- γ и TNF- α с использованием 12-дневных предварительно простимулированных МКПК (Фиг. 4б). Были подтверждены P^I_1 и P^I_2 -специфические CD8⁺ Т-клеточные ответы, функционально охарактеризованные выработкой IFN- γ (P^I_1 : 1,6%, P^I_2 : 1,7% CD8⁺ Т-клеток) и TNF- α (P^I_1 : 2,6%, P^I_2 : 2,4% CD8⁺ Т-клеток). Перекрестный анализ ELISPOT с использованием МКПК А*03-положительных здоровых доноров, простимулированных пептидами P^I_1 и P^I_2 не продемонстрировали значимой выработки IFN- γ (0/8, Фиг. 4с). Эти исходные исследования демонстрируют, что определенные в настоящем описании пептиды LiTAP могут потенциально выполнять функцию ОМЛ-специфических Т-клеточных эпитопов.

Анализ лигандома HLA II класса выявляет дополнительные мишени и точно определяет входящие в состав потенциально синергетические лиганды

С помощью анализа перекрытия исходных протеом HLA II класса было идентифицировано 396 белков (44,7%) представленных 1079 различными HLA-лигандами, которые эксклюзивно представлены в лигандоме HLA клеток ОМЛ. Было установлено, что в клетках ОМЛ 53,3% (472 белка) и 15,1% (134 белка) его исходного протеома являются общими с МКПК и МККМ, соответственно. МККМ демонстрируют 88,2% (127 белков) перекрытий исходного протеома с МКПК. Проведя сравнение профилей исходного протеома HLA, как описано выше для HLA I класса, заявители смогли идентифицировать 36 антигенов LiTAA (представленных 152 различными лигандами HLA II класса) с частотой представленности $\geq 20\%$. Наиболее высокий ранг антигена LiTAA II класса (A1BG) был установлен на образцах 6 из 12 (50%) пациентов,

представленных 5 различными лигандами. В целях идентификации антигенов LiTAA, представленных в обоих лигандах, HLA I класса и II класса, заявители затем сравнивали соответствующие ОМЛ-эксклюзивные исходные протеомы. Это выявило панель из лишь 43 общих исходных белков (3,0%/10,4% исходного протеома HLA I класса/HLA II класса, соответственно). С помощью картирования соответствующих лигандов I класса в противопоставление II классу идентифицировали 3 пептида, связывающихся с молекулами HLA II класса, содержащих полную последовательность лигандов HLA I класса.

Чтобы охарактеризовать функциональные свойства пептидов LiTAP, презентующихся молекулами HLA II класса, заявители произвели 12-дневные повторные исследования методом IFN- γ ELISPOT. Для 3 из 7 пептидов LiTAP с высоким рангом у пациентов с ОМЛ был обнаружен значимый уровень выработки IFN- γ . Т-клеточные ответы были обнаружены для пептида P^{II}₁ (CLSTN1₈₃₆₋₈₅₂) у 4 из 15 (26,7%), для P^{II}₂ (LAB5A₁₂₃₋₁₃₈) у 3 из 15 (20,0%) и для P^{II}₃ (MBL2₁₉₁₋₂₀₆) у 2 из 15 (13,3%) пациентов с ОМЛ. На Фиг. 5е показан пример частоты специфических Т-клеток для пептидов P^{II}₁, P^{II}₂ и P^{II}₃ у одного пациента с ОМЛ. Перекрестный анализ методом ELISPOT с использованием МКПК здоровых доноров, простимулированные пептидами P^{II}₁, P^{II}₂ и P^{II}₃, не продемонстрировали значимой выработки IFN- γ (0 из 8). Таким образом, определенные в настоящем описании ОМЛ-специфические эпитопы HLA II класса могут оказаться полезными дополнительными компонентами в составе вакцины на основе пептидов, связанных с молекулами HLA I класса.

ПРИМЕР 2:

Профили экспрессии генов, кодирующих пептиды по изобретению

Не все пептиды из ОМЛ, идентифицированные как презентуемые на поверхности опухолевых клеток молекулами МНС, подходят для иммунотерапии, потому что большинство этих пептидов получены из нормальных клеточных белков, экспрессируемых многими видами клеток. Только немногие из этих пептидов являются опухолеассоциированными и, скорее всего, способны индуцировать Т-клетки с высокой специфичностью распознавания опухоли, из которой они были получены. В целях идентификации таких пептидов и минимизации риска аутоиммунитета, вызванной вакцинацией, изобретатели концентрировали свое внимание на тех пептидах, которые

получены из белков, экспрессированных в избытке на опухолевых клетках в сравнении с большинством нормальных тканей.

Идеальный пептид будет получен из белка, являющегося уникальным для опухоли и не присутствующего ни в одной другой ткани. Для идентификации пептидов, которые получены из генов с профилем экспрессии, похожим на идеальный, идентифицированные пептиды соотносили с белками и генами, из которых они были получены и которые их кодируют, соответственно, и построены профили экспрессии этих генов.

Источники и приготовление РНК

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

Суммарная РНК здоровых человеческих тканей была куплена (Ambion, Хантингтон, Великобритания; Clontech, Гейдельберг, Германия; Stratagene, Амстердам, Нидерланды; BioChain, Хейард, Калифорния, США). РНК нескольких индивидов (от 2 до 123 индивидов) была смешана таким образом, что РНК каждого индивида имела равный вес.

Качество и количество всех образцов РНК оценивали на биоанализаторе Agilent 2100 (Agilent, Вальдбронн, Германия) с использованием набора RNA 6000 Pico LabChip Kit (Agilent).

Эксперименты с микрочипами

Анализ экспрессии генов всех образцов РНК из опухолевой и нормальной ткани был произведен с помощью олигонуклеотидных микрочипов Affymetrix Human Genome (HG) U133A или HG-U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Санта Клара, Калифорния, США). Все этапы были выполнены по руководством Affymetrix. Вкратце, двухнитевую кДНК

синтезировали из 5–8 мкг суммарной РНК с использованием SuperScript RTII (Invitrogen) и олиго-dT-T7 праймера (MWG Biotech, Эберсберг, Германия), как описывается в руководстве. Транскрипцию *in vitro* производили с использованием набора для мечения РНК-транскриптов BioArray High Yield RNA Transcript Labelling Kit (ENZO Diagnostics, Inc., Фарминггейл, Нью-Йорк, США) для чипов U133A или набора GeneChip IVT Labelling Kit (Affymetrix) для чипов U133 Plus 2.0 с последующей фрагментацией, гибридизацией кРНК и окрашиванием стрептавидин-фикоэритрином и биотинилированным антистрептавидиновым антителом (Molecular Probes, Лейден, Нидерланды). Изображения сканировали на Agilent 2500A GeneArray Scanner (U133A) или Affymetrix Gene-Chip Scanner 3000 (U133 Plus 2.0), а данные анализировали в программе GCOS (Affymetrix) с использованием настроек по умолчанию для всех параметров. Для нормализации использовались 100 служебных генов, предоставленных Affymetrix. Относительные значения экспрессии были подсчитаны из отношений логарифмов зарегистрированных сигналов, полученных компьютерной программой, а значение для образца нормальной почки было произвольно задано значением 1,0.

Типичные профили экспрессии исходных генов, предложенных в настоящем изобретении, которые в высокой степени экспрессированы в избытке или эксклюзивно экспрессированы в клетках ОМЛ, представлены на Фиг. 3.

ПРИМЕР 3:

Иммуногенность *in vitro* для пептидов ОМЛ, 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 пока что 9 рестриктированных по HLA-A*0201 пептидов TUMAP по изобретению, демонстрируя, что эти пептиды являются Т-клеточными эпитопами, против которых у человека имеются CD8⁺ Т-клетки-предшественники.

Прайминг CD8-положительных Т-клеток *in vitro*

В целях проведения стимуляций *in vitro* искусственными антигенпрезентирующими клетками (иАПК), нагруженными комплексом пептид-МНС (рМНС) и антителом к CD28, заявители сначала выделили CD8⁺ Т-клетки из свежего продукта лейкофереза HLA-A*02 методом позитивной селекции с помощью микросфер CD8 (Miltenyi Biotec, Бергиш-Гладбах, Германия). Кровь была получена от здоровых доноров (после подписания формы согласия) из Отделения трансфузиологии г. Тюбингена, Германия.

Выделенные CD8⁺ лимфоциты или МКПК 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 (Promo Cell, 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.

Все комплексы рМНС, использованные для нагружения иАПК и считывания данных цитометра, были получены методом обмена МНС-лигандами под воздействием УФ-излучения (Rodenko B, et al. Generation of peptide-MHC class I complexes through UV-mediated ligand exchange. Nat Protoc. 2006;1(3):1120-32) с минимальными изменениями. В целях определения количества мономера рМНС, полученного при обмене, проводили анализы с помощью сэндвич-варианта ELISA по Rodenko B. и соавт., 2006.

Очищенный костимуляторный IgG2a мыши к антителам человека CD28 Ab 9.3 (Jung G, et al. Induction of cytotoxicity in resting human T lymphocytes bound to tumor cells by antibody heteroconjugates. Proc Natl Acad Sci USA. 1987 Jul;84(13):4611-5) был химически биотинилирован с использованием сульфо-N-гидроксисукцинимидобиотина, как рекомендуется изготовителем (Perbio, Бонн, Германия). Использованные микросферы

представляли собой полистирольные частицы размером 5,6 мкм, покрытые стрептавидином (Bangs Laboratories, Иллинойс, США).

pMHC, использованные для положительных и отрицательных контрольных стимуляций, были A*0201/MLA-001 (пептид ELAGIGILTV (SEQ ID NO: 606) из модифицированного Melan-A/MART-1) и A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI из DDX5 (SEQ ID NO: 606)), соответственно.

800 000 микросфер / 200 мкл вносили в лунки 96-луночного планшета в присутствии 4 x 12,5 нг другого биотинилированного комплекса pMHC, 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 3-4 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 3-4 дней при 37°C. Данный цикл стимуляций производили в общей сложности три раза. Для считывания с pMHC-мультимеров использовали 8 различных молекул pMHC на цикл. Использовался двумерный комбинаторный подход к кодировке, как было описано ранее (Andersen et al., 2012 Parallel detection of antigen-specific T cell responses by combinatorial encoding of MHC multimers. Nat Protoc. 2012 Apr 12;7(5):891-902.) 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 pMHC 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 ОМЛ

Для проанализированных пептидов, связанных с молекулами HLA I класса, иммуногенность *in vitro* может быть продемонстрирована генерированием пептид-специфических Т-клеточных линий. Типичные результаты проточного цитометрического анализа после TUMAP-специфического окрашивания мультимеров для двух пептидов по изобретению показаны на Фиг. 4 вместе с соответствующими отрицательными контролями.

ПРИМЕР 4:

Синтез пептидов

Все пептиды были синтезированы стандартным и общепринятым методом твердофазного синтеза пептидов с использованием Fmoc-методики. После очистки препаративной ОФ ВЭЖХ (обращеннофазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией) проводилась процедура обмена ионов для внедрения физиологически совместимых противоионов (например, трифторацетата, ацетата, аммония или хлорида).

Идентичность и чистоту каждого отдельного пептида определяли с помощью масс-спектрометрии и аналитической ОФ ВЭЖХ. После процедуры обмена ионов были получены пептиды в виде белого или грязно-белого лиофилизата со степенью чистоты от 90% до 99,7%.

Все пептиды TUMAP предпочтительно вводят в виде солей трифторацетатов или ацетатов, возможны также другие подходящие солевые формы. Для проведения измерений примера 3 были использованы пептиды в виде трифторацетатов.

ПРИМЕР 5:

Анализ связывания с МНС – МНС I класса

Пептиды-кандидаты для Т-клеточной терапии по настоящему изобретению далее были испытаны на их способность связываться с МНС (аффинность). Были получены отдельные комплексы пептид-МНС с помощью реакции обмена с рассматриваемым пептидом в том виде, в котором его анализировали. 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, B. et al., Nat Protoc. 1 (2006): 1120-1132).

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 2% БСА, содержащем блокирующий буфер. Полученные в результате рефолдинга мономеры HLA-A*0201/MLA-001 служили в качестве стандарта, покрывающего диапазон 15-500 нг/мл. Мономерные комплексы пептид-МНС после реакции обмена под воздействием УФ-излучения 100-кратно разводили в блокирующем буфере. Образцы инкубировали в течение 1 ч при 37°C, промывали четыре раза, инкубировали в течение 1 ч при 37°C с 2 мкг/мл пероксидазы хрена, конъюгированной с антителом к $\beta 2m$, снова промывали и проводили обнаружение с помощью раствора ТМБ; реакцию останавливали NH_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 авидность по отношению к молекулам МНС и предотвращают диссоциацию комплексов МНС.

Показатели связывания для МНС I класса для испытанных пептидов составили; <20 % = +; 20 % - 49 % = ++; 50 % - 75 % = +++; >= 75 % = ++++

Seq ID NO.	последовательность	Пептидный обмен
54	AVIEAEKIAQV	++++
266	KLQEQLAQL	++++
36	SLLYKVPYV	++++
251	VLGGKAFLEHL	++++

ПРИМЕР 6:

Анализ связывания с МНС – МНС II

класса

Белки HLA II класса подразделяют на три основные изотипа HLA-DR, -DP и DQ, которые кодируются многочисленными гаплотипами. Комбинация различных α - и β -цепей увеличивает разнообразие белков HLA II класса, обнаруженных в произвольной популяции. Таким образом, выбранные пептиды TUMAP HLA II класса должны связываться с несколькими различными молекулами HLA-DR (т. е. проявлять способность к промискуитетному связыванию), чтобы быть в состоянии способствовать эффективному Т-клеточному ответу у значимой процентной доли пациентов.

Промискуитетное связывание GALNT7-001 и ERGIC1-001 с различными гаплотипами HLA-DR и стабильность образованных комплексов оценивались с помощью анализа связывания *in vitro*.

Испытанными пептидами были:

Sequence ID No	Ид. № пептида	Последовательность	длина
597	GALNT7-001	GNQLFRINEANQLMQ	15
604	ERGIC1-001	FEGQFSINKVPGNFHVS	17

Семь исследованных гаплотипов HLA-DR выбраны по их частотой встречаемости в HLA-A*02 и HLA-A*24-положительной популяции североамериканцев. Данные получены из HLA-типизирования 1,35 миллиона добровольцев, зарегистрированных в Национальной программе донорства костного мозга (Mori M, Beatty PG, Graves M, Boucher KM, Milford EL (1997). HLA gene and haplotype frequencies in the North American population: the National Marrow Donor Program Donor Registry. Transplantation 64, 1017-1027). Анализируемая популяция была подразделена на следующие этнические группы: Американцы европеоидной расы (N=997 193), афроамериканцы (N=110 057),

монголоиды (N=81 139), латиноамериканцы (N=100 128) и коренные американцы (индейцы) (N=19 203).

Используемый анализ связывания МНС с пептидом определял способность каждого пептида-кандидата связываться с молекулой HLA II класса выбранного гаплотипа и стабилизировать комплекс HLA-пептид. Для этого пептиды-кандидаты собраны *in vitro* с конкретным белком HLA II класса.

Способность пептидов-кандидатов связываться с конкретной молекулой HLA сравнивают со значением для контрольного пептида, который, как известно, имеет очень сильную способность к связыванию (положительный контроль) для каждого гаплотипа HLA. Экспериментальное значение среднеквадратической погрешности получено из экспериментов по связыванию положительных контролей, проведенных в трех параллельных измерениях.

Помимо аффинности пептида к конкретной молекуле HLA длительная стабильность образованного комплекса HLA-пептид является основополагающей для появления иммунного ответа. По этой причине присутствие образованного комплекса HLA-пептид измеряли после его инкубирования в течение 24 ч при 37°C. Стабильность образованных комплексов МНС-пептид рассчитывали как процентное соотношение показателей связывания по прошествии 24 ч и показателей связывания, полученных сразу же после процесса рефолдинга (по точкой 0).

Анализ GALNT7-001 и ERGIC1-001 в рамках анализа силы связывания по методике REVEAL[®] комплекса МНС-пептид показал, что оба пептида связываются с HLA различных гаплотипов. Было показано, что оба пептида образуют комплекс с пятью из семи исследованных гаплотипов HLA (HLA-DR1, -DR2, -DR4, -DR5, и -DR7)**Error! Reference source not found.** Установленные показатели связывания находились в диапазоне от 0,02 до приблизительно 78,5% в сравнении с положительным контролем, и были отчетливо выше показателей для несвязывающихся пептидов. GALNT7-001 демонстрировал сильное промискуитетное связывание (т. е. с показателем связывания свыше 15%, показатель, который основан на опыте поставщика услуг, рассматривается как отражающий сильное связывание) с четырьмя из семи исследованных гаплотипов HLA (HLA-DR1, -DR2, -DR4, -DR7). Для ERGIC-001 показатели связывания для двух

исследованных гаплотипов HLA составили примерно или выше 15% (HLA-DR4, -DR5). Ни один из этих двух пептидов не связывается ни с HLA-DR3, ни HLA-DR6.

Анализ стабильности образованных комплексов HLA-GALNT7-001 и HLA-ERGIC1-001 показал, что 4 из 7 исследованных комплексов HLA-пептид были стабильны спустя 24 ч при 37°C (HLA-DR1, -DR4, -DR5, -DR7).

Анализ способности к связыванию пептидов GALNT7-001 и ERGIC1-001 с наиболее частыми гаплотипами HLA-DR при использовании анализа связывания *in vitro* позволил обнаружить способность к связыванию обоих пептидов. Оба пептида образовывали комплексы с 5 из 7 исследованных гаплотипов HLA-DR. Таким образом, анализ показал существенную способность к связыванию пептида GALNT7-001 по меньшей мере с 4 и пептида ERGIC1-001 – по меньшей мере с 2 гаплотипами HLA-DR. Кроме того, 4 из 5 образованных комплексов HLA-пептид для каждого из исследованных пептидов были стабильны в течение не менее 24 ч. Таким образом, анализ показал, что оба пептида должны быть способны внести свой вклад в получение эффективного Т-клеточного ответа у значимой процентной доли пациентов.

Список цитируемой литературы

- Babbio, F. et al., Cell Cycle **3** (2004): 486-490
- Bidkhor, G. et al., PLoS.One. **8** (2013): e67552
- Enesa, K. et al., Adv.Exp.Med.Biol. **809** (2014): 33-48
- Greiner, J. et al., Int.J Cancer **106** (2003): 224-231
- Huang, A. et al., Cancer Res. **65** (2005): 5607-5619
- Isaksson, H. S. et al., Oncotarget. **5** (2014): 4040-4049
- Kuznetsova, E. B. et al., Mol.Biol.(Mosk) **41** (2007): 624-633
- Liu, D. et al., Int.J Oncol. **45** (2014): 1232-1240
- McLellan, J. et al., Mol.Biol.Cell **20** (2009): 5306-5313
- Oh, Y. et al., J Biol.Chem **287** (2012): 17517-17529
- Price, J. C. et al., PLoS.One. **8** (2014): e63313
- Rao, W. et al., Carcinogenesis **35** (2014a): 1573-1581

- Rao, W. et al., PLoS.One. **9** (2014b): e85705
- RefSeq, The NCBI handbook [Internet], Chapter 18 (2002)
- Sand, M. et al., Mol.Carcinog. **51** (2012): 916-922
- Scanlan, M. J. et al., Cancer Immun. **1** (2001): 4
- Soupene, E. et al., J Lipid Res. **49** (2008): 1103-1112
- Tian, Y. et al., Int.J Oncol. **43** (2013): 2082-2090
- Uchiyama, K. et al., J Cell Biol. **159** (2002): 855-866
- Vanneste, D. et al., Curr.Biol. **19** (2009): 1712-1717
- Yotov, W. V. et al., Genes Chromosomes.Cancer **26** (1999): 62-69
- Zhang, J. et al., J Allergy Clin.Immunol. **115** (2005): 548-554
- Zhou, B. et al., Cancer Biol.Ther **13** (2012a): 871-879
- Zhou, B. et al., Cancer Lett. **322** (2012b): 195-203

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептид, который связывается с молекулой главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) I класса, где указанный пептид имеет длину до 30 аминокислот, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:40 или SEQ ID NO:46, или одну из SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41 по SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47 по SEQ ID NO: 265, SEQ ID NO: 267 по SEQ ID NO: 447 или SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 605, или его фармацевтически приемлемая соль.
2. Пептид по п.1, где пептид имеет длину между 8 и 14 аминокислот, и предпочтительно где пептид состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO:40 или SEQ ID NO:46, или одной из SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41 по SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47 по SEQ ID NO: 265, SEQ ID NO: 267 по SEQ ID NO: 447 или SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 605, или его фармацевтически приемлемой соли.
3. Пептид по п.1 или п.2, где пептид включает непептидные связи, выбранные из $-\text{CH}_2\text{-NH}$, $-\text{CH}_2\text{S-}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$, $-\text{CH=CH-}$, $-\text{COCH}_2\text{-}$, $-\text{CH(OH)CH}_2\text{-}$ и $-\text{CH}_2\text{SO-}$.
4. Пептид по п.1 или п.2, где пептид является частью слитого белка, в частности, включающего 1-80 N-терминальных аминокислот антиген-ассоциированной инвариантной цепи HLA-DR (Ii).
5. Антитело или фрагмент антитела, где антитело или фрагмент антитела специфически связывается с главным комплексом гистосовместимости человека (МНС) I или II класса в комплексе с HLA-рестриктированным антигеном, где HLA-рестриктированный антиген является пептидом по любому из пп. 1-3.
6. Антитело или фрагмент антитела по п. 5, являющееся моноклональным антителом, биспецифичным антителом и/или химерным антителом.
7. Т-клеточный рецептор, необязательно, растворимый Т-клеточный рецептор, который специфически связывается с HLA-лигандом, где HLA-лиганд является пептидом по

любому из пп.1-3, полученный путем идентификации Т-клеточного клона, содержащего ТКР, который специфически связывается с HLA-лигандом, являющимся пептидом по любому из пп.1-3, выделения и клонирования нуклеиновой кислоты, кодирующей ТКР, в вектор экспрессии, рекомбинантной экспрессии ТКР в подходящей клетке, и очищения ТКР от указанной клетки и/или ее культуральной среды.

8. Нуклеиновая кислота, кодирующая пептид по любому из пп.1–4.

9. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или фрагмент антитела по п. 5 или 6, или Т-клеточный рецептор по п. 7.

10. Клетка-хозяин, включающая нуклеиновую кислоту по п. 8 или 9.

11. Клетка-хозяин по п. 10, являющаяся антигенпрезентирующей клеткой, например, дендритной клеткой.

12. Способ получения пептида по любому из пп. 1, 2 или 4, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 10 или п. 11 и выделение указанного пептида из указанной клетки-хозяина и/или его культуральной среды.

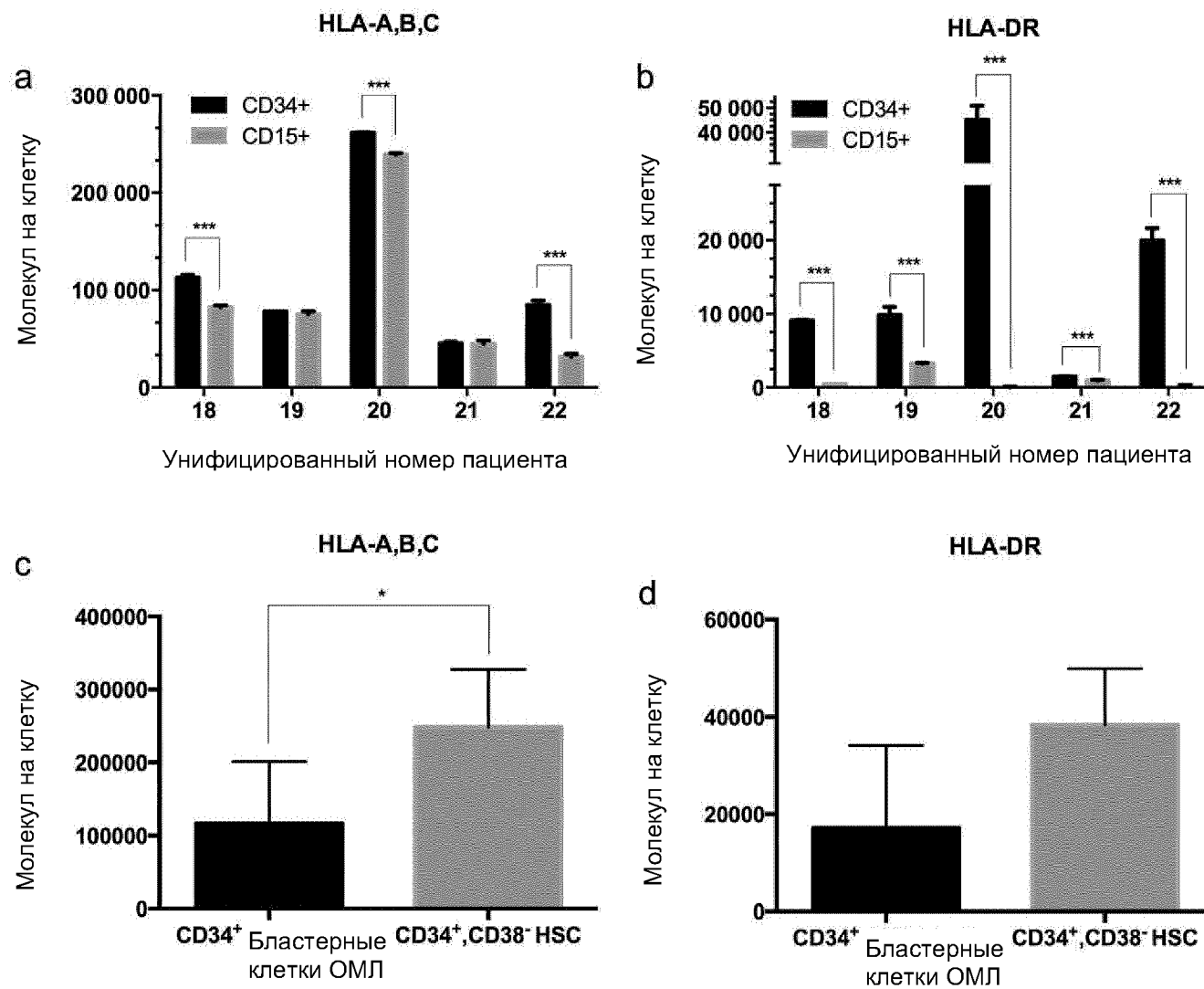
13. Способ получения Т-клеточного рецептора по п. 7, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 10 или п. 11 и выделение указанного Т-клеточного рецептора из указанной клетки-хозяина и/или его культуральной среды.

14. Способ получения активированных цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) *in vitro*, включающий контактирование ЦТЛ *in vitro* с нагруженными антигеном молекулами МНС I класса человека, экспрессированными на поверхности подходящей антигенпрезентирующей клетки в течение периода времени, достаточного для активации указанных ЦТЛ антиген-специфическим образом, где антиген является пептидом по п.1 или п.2.

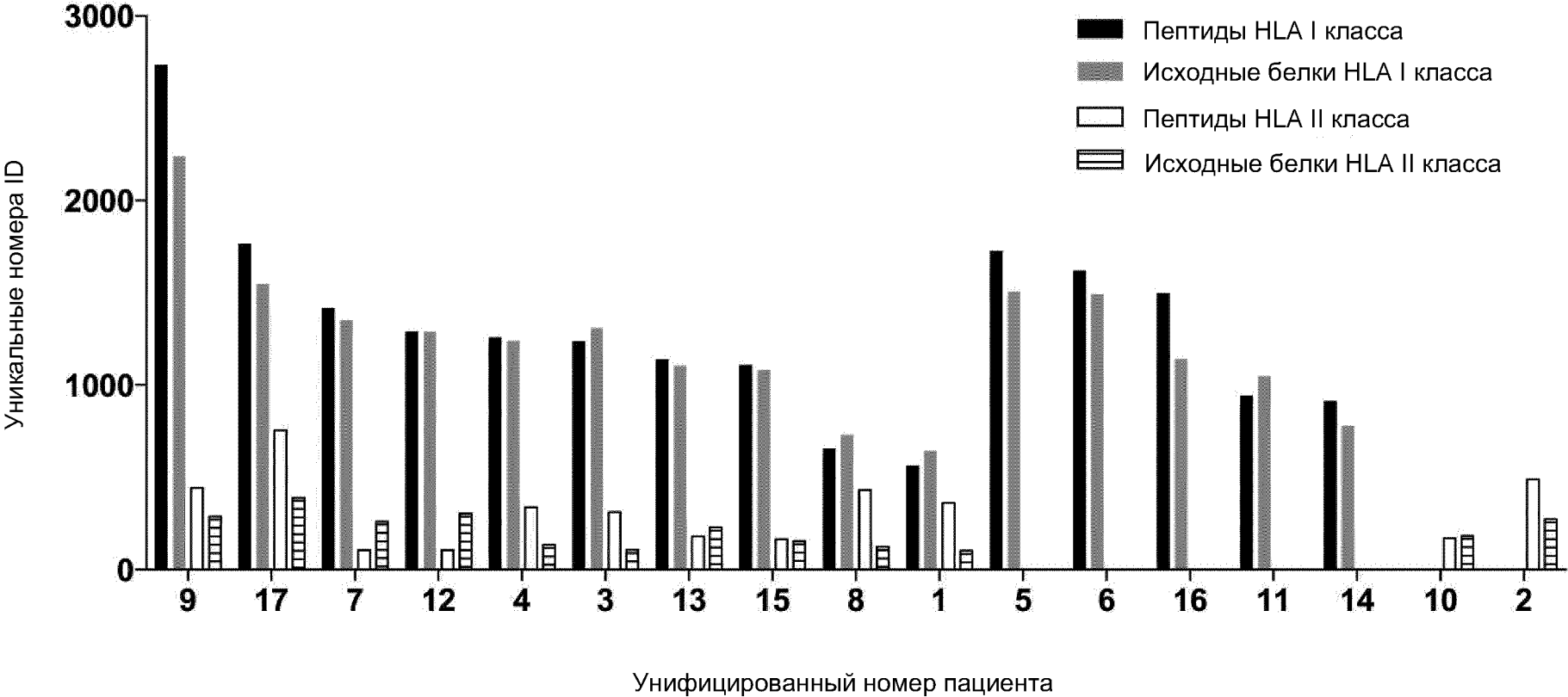
15. Способ по п. 14, где антиген нагружен на молекулы МНС I класса, экспрессированные на поверхности подходящей антигенпрезентирующей клетки, при контактировании достаточного количества антигена с антигенпрезентирующей клеткой.
16. Активированный цитотоксический Т-лимфоцит (ЦТЛ), который селективно распознает клетку, которая аберрантно экспрессирует полипептид, включающий аминокислотную последовательность, указанную в любом из п. 1 или п.2, полученный способом по любому из пп. 14 или 15.
17. Способ уничтожения раковых клеток-мишеней у пациента, включающий введение указанному пациенту эффективного числа цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) по п. 16.
18. Применение пептида по п. 1 или п.2 для изготовления лекарственного средства для лечения рака.
19. Применение антитела по п.5 или п.6, или Т-клеточного рецептора по п. 7 для изготовления лекарственного средства для лечения рака.
20. Применение нуклеиновой кислоты по п. 8 или п. 9 для изготовления лекарственного средства для лечения рака.
21. Применение клетки-хозяина по п. 10 или п. 11 для изготовления лекарственного средства для лечения рака.
22. Применение активированного цитотоксического Т-лимфоцита по п. 16 для изготовления лекарственного средства для лечения рака.
23. Применение по любому из пп. 18-22, где указанное лекарственное средство является вакциной с противораковым действием.
24. Фармацевтическая композиция для лечения рака, включающая по меньшей мере один активный ингредиент, выбранный из группы, состоящей из пептида по любому из пп. 1–

4, антитела или фрагмента антитела по п.5 или п.6, Т-клеточного рецептора по п. 7, нуклеиновой кислоты по п. 8 или п. 9, клетки-хозяина по п. 10 или п. 11 или активированного цитотоксического Т-лимфоцита по п. 16, и фармацевтически приемлемый носитель.

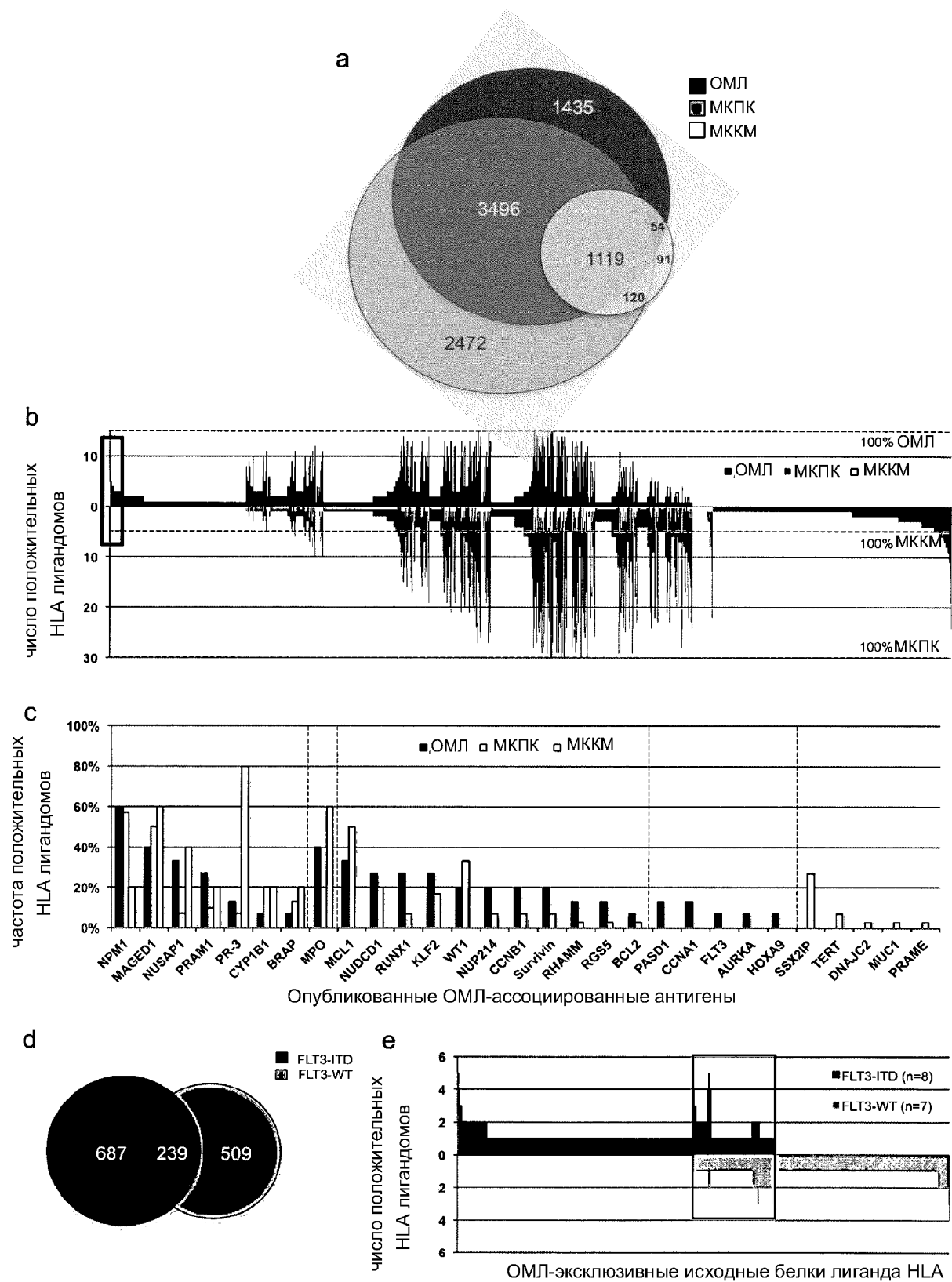
ФИГ. 1



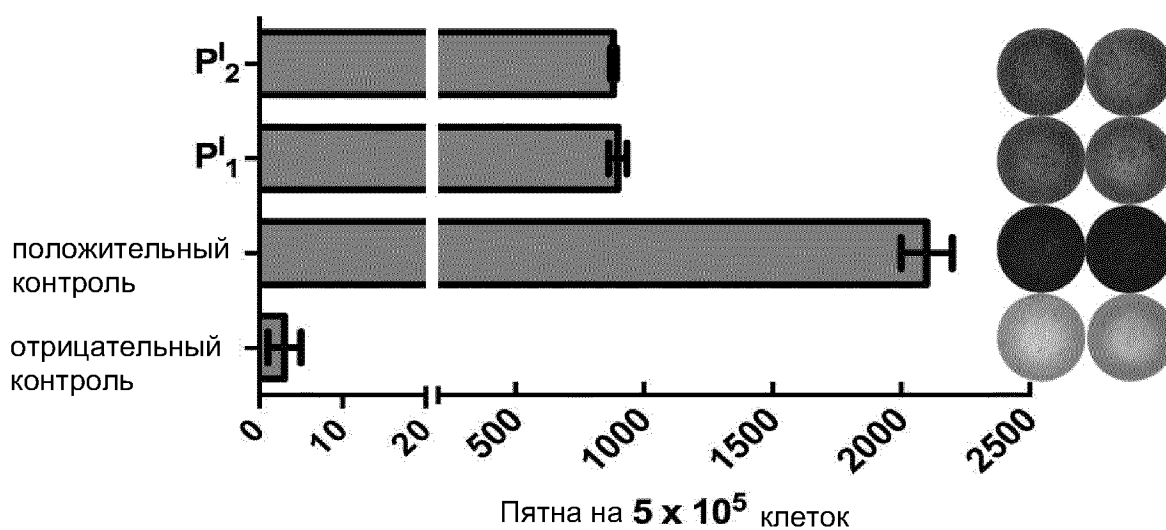
ФИГ. 2



ФИГ. 3



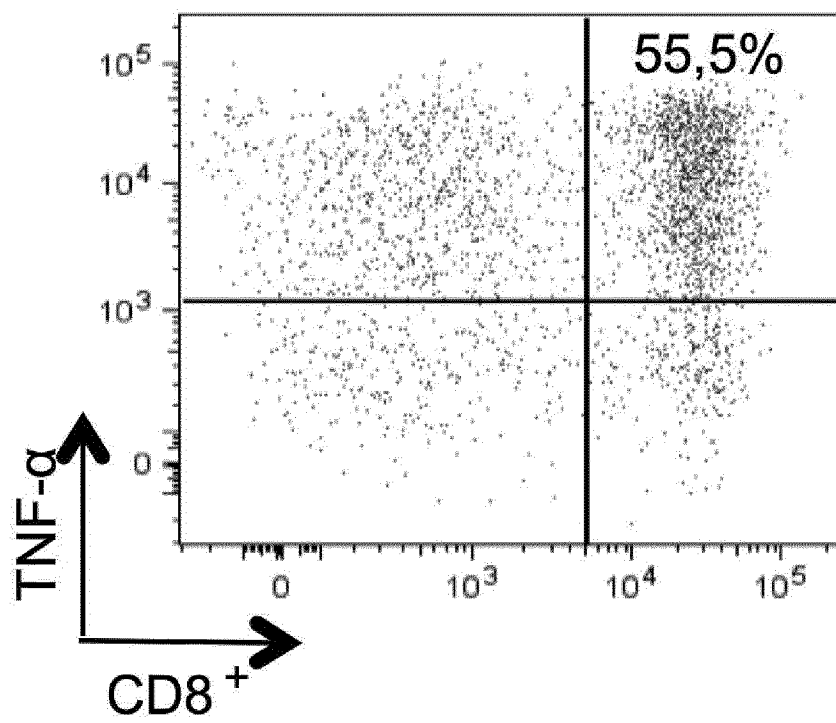
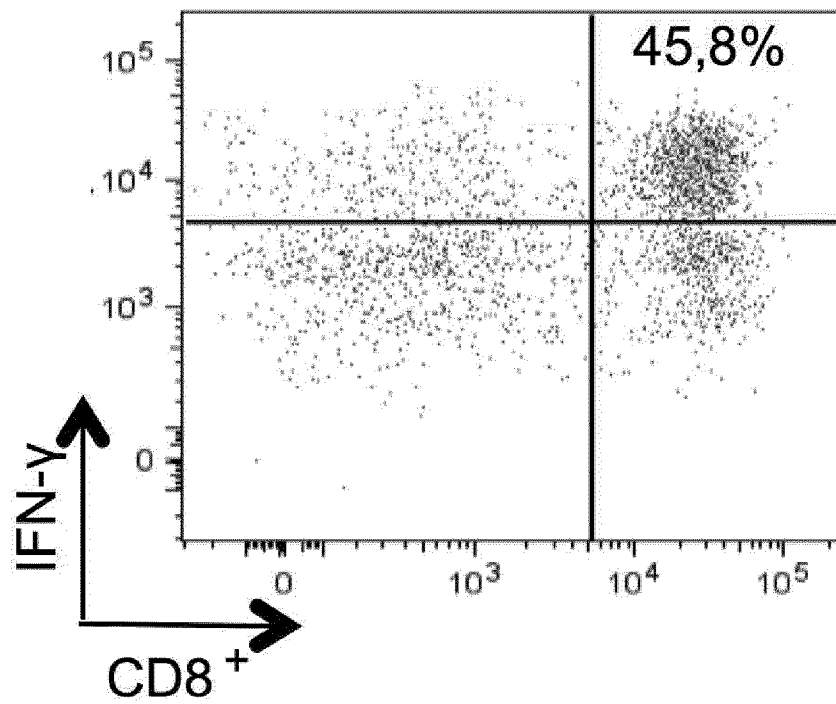
ФИГ. 4а



	ПЕПТИД	ИСХОДНЫЙ БЕЛОК
pI_1	HGYENPTYK	APLP2
	ALRNQATMVQK	DGKZ
	FTAEFSSRY	FAF1
	GVLGTVVHGK	MTCH2
pI_2	KTYTKSSHLK	KLF2
	VIYNEQMASK	METTL7A
	ASAAASGGLLK	VCPIP1
	RVYNTDPLKEK	WDR45L

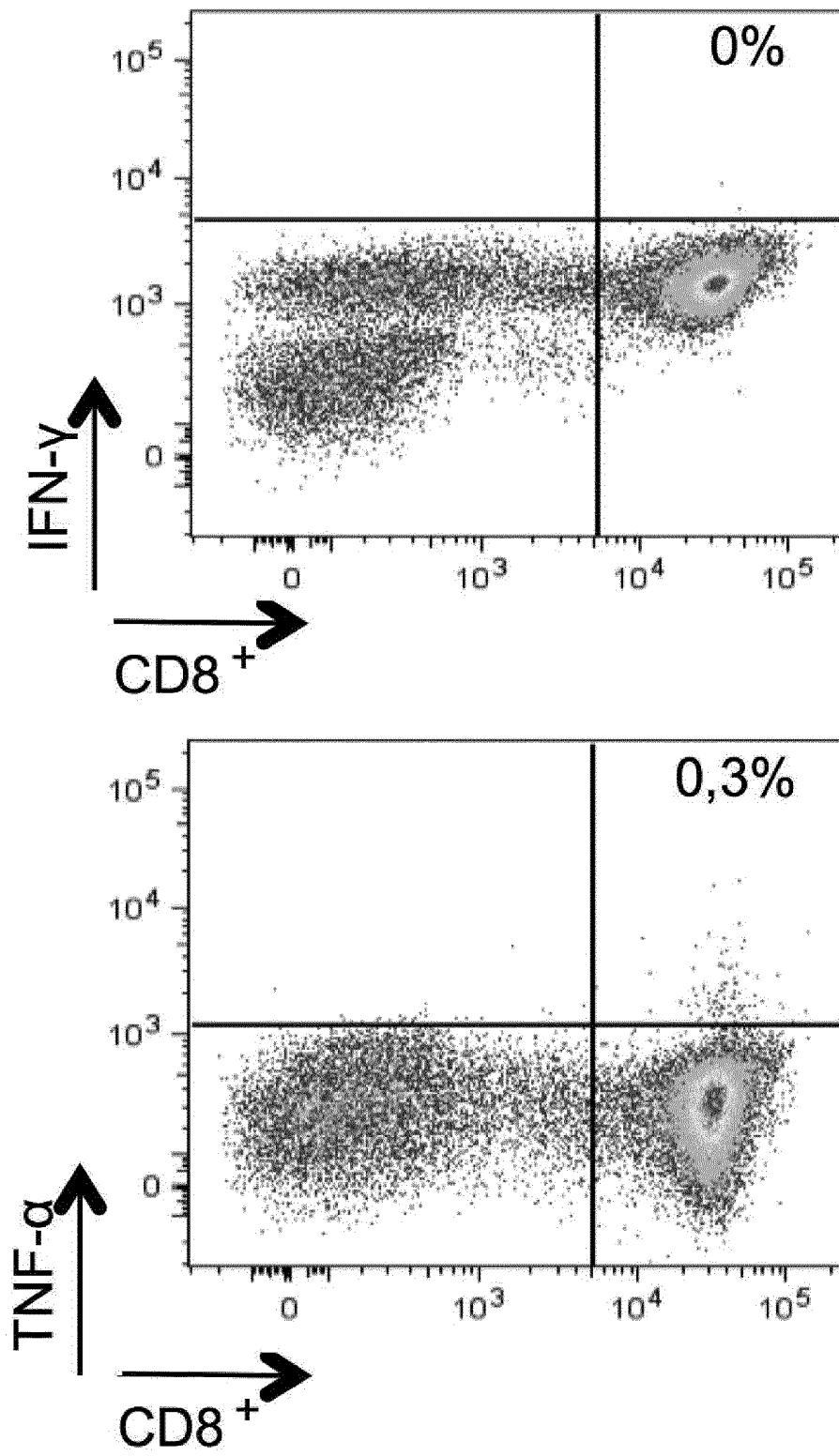
ФИГ. 4b

положительный контроль

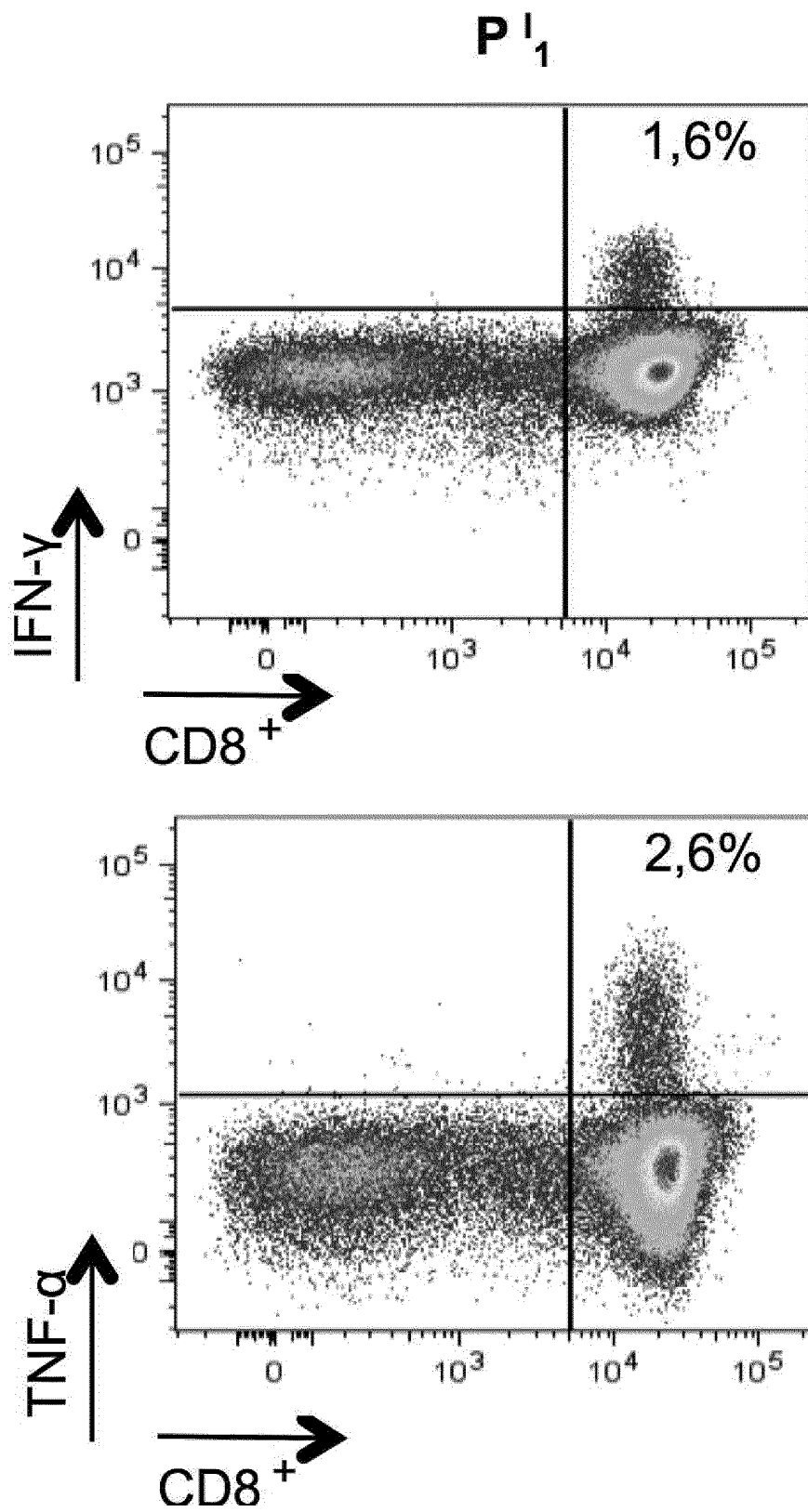


ФИГ. 4b
продолжение

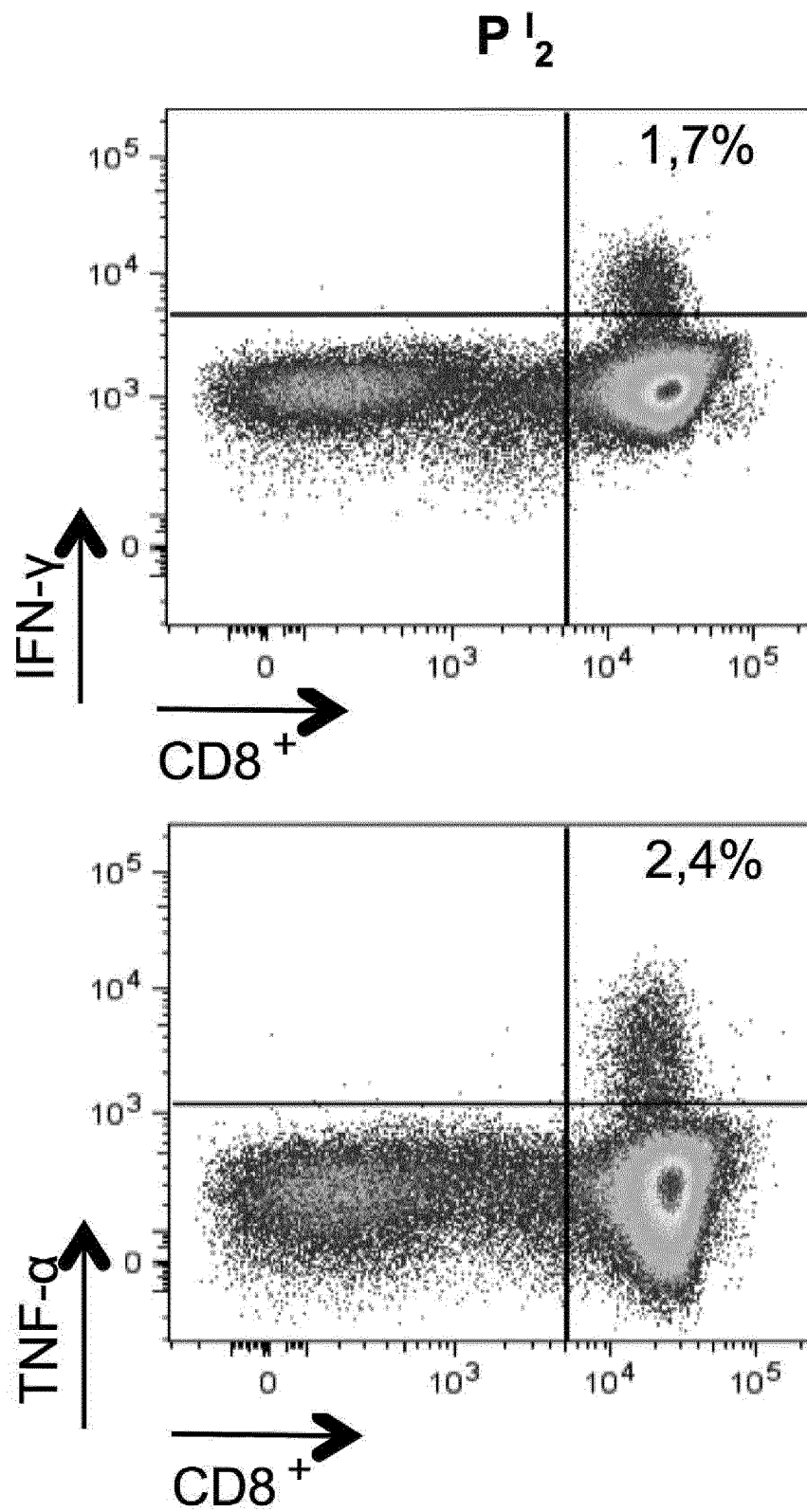
отрицательный контроль



ФИГ. 4b
продолжение

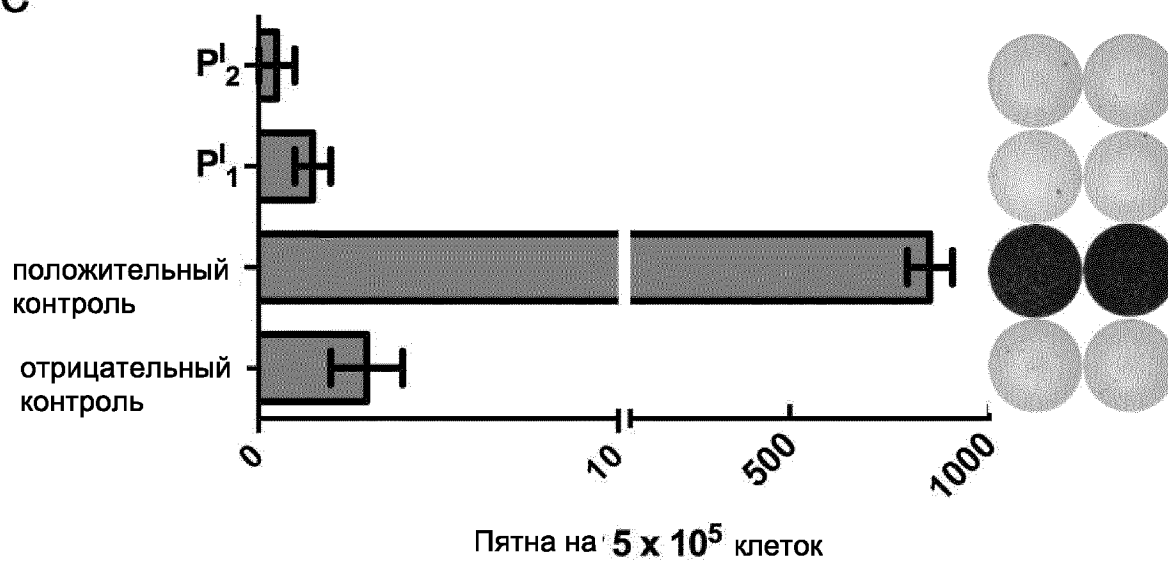


ФИГ. 4b
продолжение

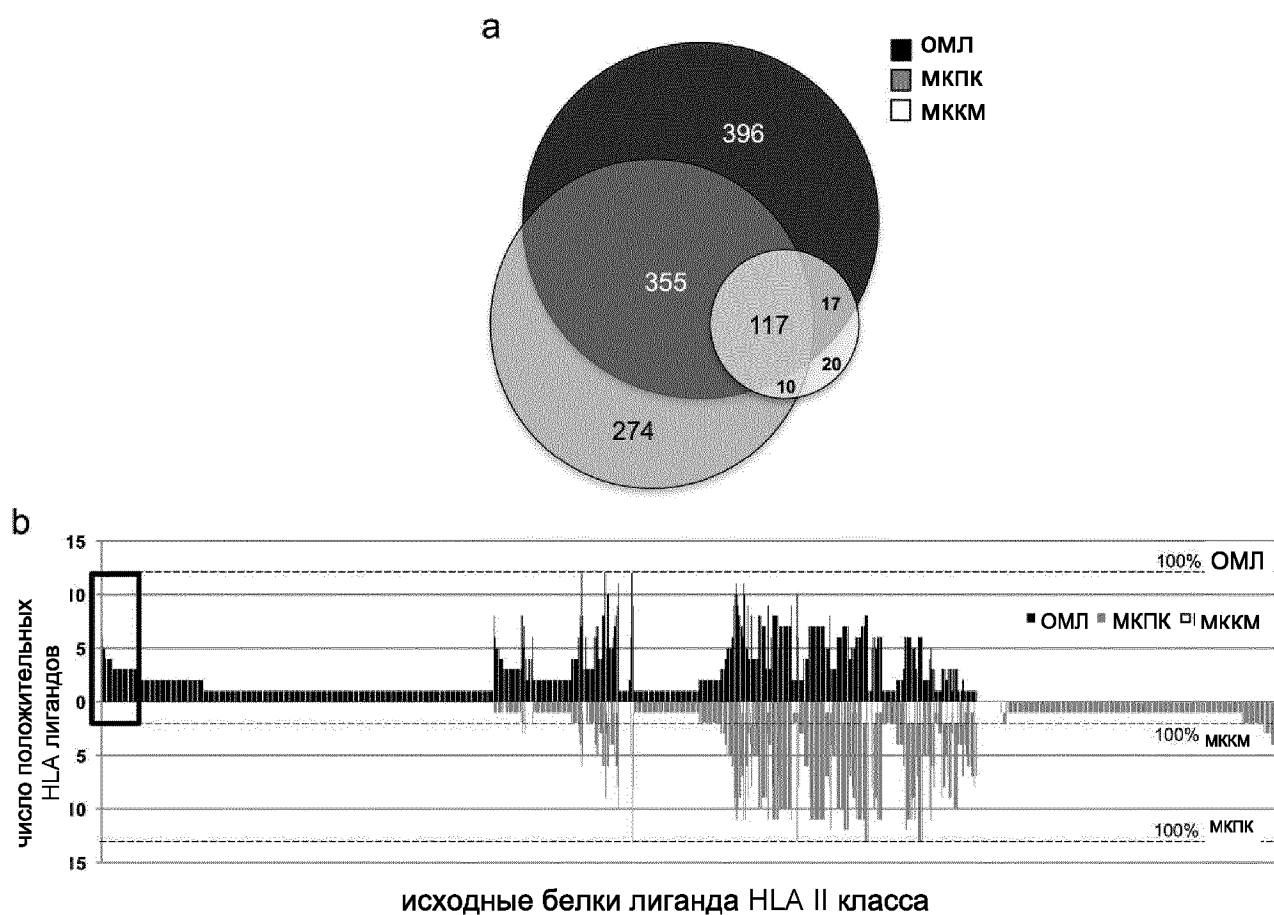


ФИГ. 4с

С

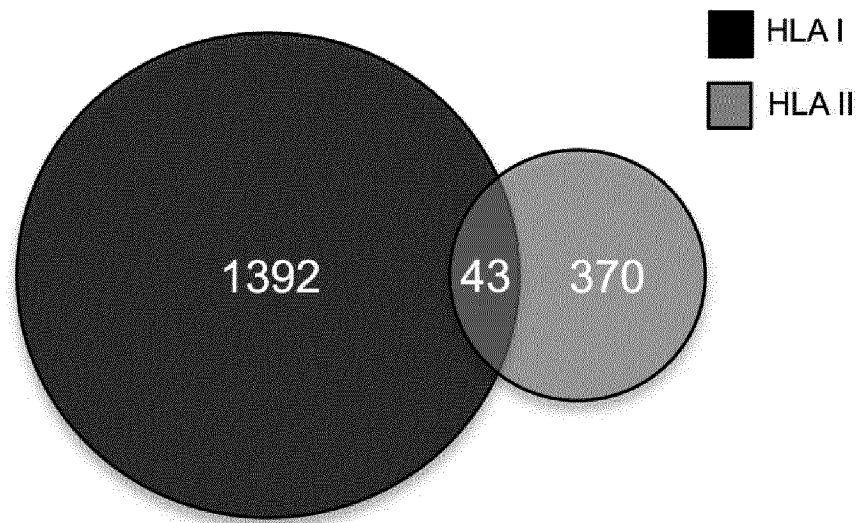


ФИГ. 5



ФИГ. 5
продолжение

с

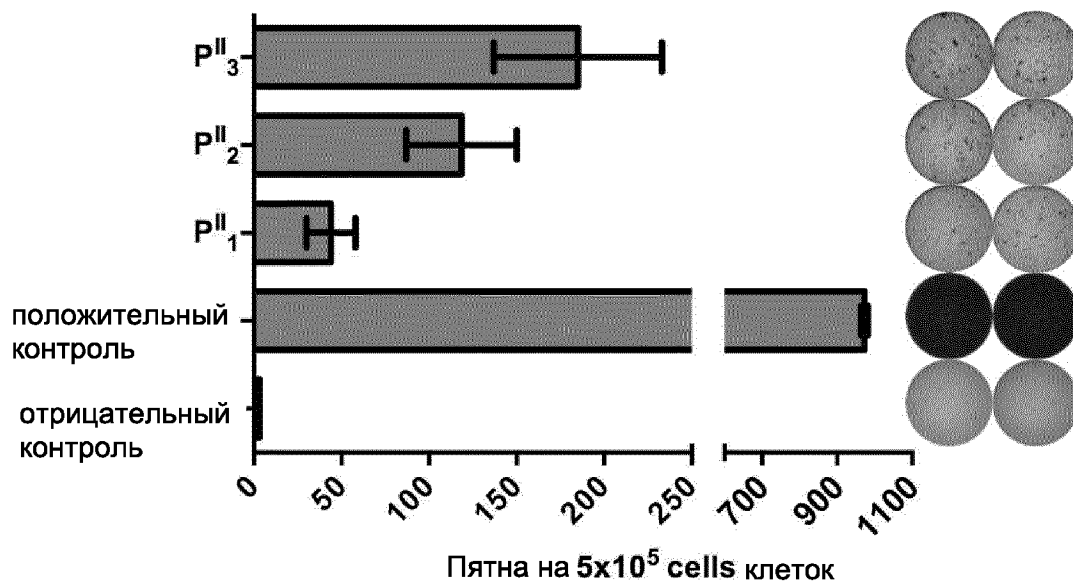


d

Исходный белок	HLA I класса	унифицированный номер пациента	HLA II класса	унифицированный номер пациента
CA1	SYNPATAKEI	14	SVSYNPATAKEII	10
	SYNPATAKEII	14		
BCAT1	ILSKLTDIQY	17	ILSKLTDIQYGREE	8
	LSKLTDIQY	17		
ATP5L	EIIGKRGIIIGY	8	YVGEIIGKRGIIIGYDV	2
		13		
		14		
		17		

ФИГ. 5
продолжение

е



	Пептид	Исходный белок	CD4+ Т-клеточный ответ в ОМЛ
P^{II}_1	HRSFVDLSGHNLANPHP	CLSTN1	4/15 (26,7%)
P^{II}_2	SPNIVIALSGNKADLA	RAB5A	3/15 (20,0%)
P^{II}_3	TEGQFVDLTGNRLTYT	MBL2	2/15 /13,3%)

ФИГ. 6

