

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091833** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.11.25

(51) Int. Cl. *C07K 7/06* (2006.01)
A61K 38/08 (2019.01)
C07K 14/47 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.02.08

(54) **ПЕПТИДЫ И КОМБИНАЦИИ ПЕПТИДОВ НЕКАНОНИЧЕСКОГО
ПРОИСХОЖДЕНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ИММУНОТЕРАПИИ РАЗЛИЧНЫХ
ВИДОВ РАКА**

(31) 10 2018 103 944.1; 62/633,325; 10 2018
107 224.4

(32) 2018.02.21; 2018.02.21; 2018.03.27

(33) DE; US; DE

(62) 202091754; 2019.02.08

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

(72) Изобретатель:
**Шустер Хайко, Хоффгаард
Франциска, Фритше Йенс, Шоор
Оливер, Вайншенк Тони, Ковалевски
Дэниел (DE), Цзоу Чи-Чианг (US)**

(74) Представитель:
**Ловцов С.В., Вилесов А.С., Гавриков
К.В., Коптева Т.В., Левчук Д.В.,
Стукалова В.В., Ясинский С.Я. (RU)**

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

A1

202091833

202091833

A1

I33148WO

**ПЕПТИДЫ И КОМБИНАЦИИ ПЕПТИДОВ НЕКАНОНИЧЕСКОГО
ПРОИСХОЖДЕНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ИММУНОТЕРАПИИ РАЗЛИЧНЫХ
ВИДОВ РАКА**

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

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

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в 2012 г. рак находился среди четырех основных неинфекционных смертельно опасных заболеваний в мире. По данным за тот же год колоректальный рак, рак молочной

железы и раковые заболевания дыхательных путей находились в списке 10 наиболее распространенных причин смерти в странах с высоким уровнем доходов.

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

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

ОМЛ является вторым наиболее распространенным видом лейкоза, диагностируемым как у взрослых, так и у детей. Приблизительное число новых случаев в Соединенных Штатах составляет около 21 000 в год. Пятилетняя выживаемость людей, больных ОМЛ составляет приблизительно 25%.

Рак легких является наиболее распространенным видом рака в мире и основной причиной смерти от рака во многих странах. Рак легких подразделяется на мелкоклеточный и немелкоклеточный рак легких. НМРЛ включает гистологические типы: аденокарцинома, плоскоклеточная карцинома и крупноклеточная карцинома,

и на его долю приходится 85% всех случаев заболевания раком легких в США. Возникновение НМРЛ тесно коррелирует с распространением курения, включая курящих в настоящее время и куривших в прошлом, и, как сообщалось, пятилетняя выживаемость составляет 15% (World Cancer Report, 2014; Molina et al., 2008).

Принимая во внимание серьезные побочные эффекты и высокие расходы, связанные с лечением рака, существует необходимость идентифицировать факторы, которые могут быть использованы для лечения рака вообще и ОМЛ (острый миелоидный лейкоз), РМЖ (рак молочной железы), ХГК (холангиоцеллюлярная карцинома), ХЛЛ (хронический лимфоцитарный лейкоз), КРК (колоректальный рак), РЖП (рак желчного пузыря), ГБМ (глиобластома), РЖ (рак желудка), РПЖП (рак пищевода-желудочного перехода), ГКК (гепатоклеточная карцинома), ПлККГШ (плоскоклеточная карцинома головы и шеи), МЕЛ (меланома), НХЛ (неходжкинская лимфома), НМРЛ (немелкоклеточный рак легких), РЯ (рак яичника), РП (рак пищевода), РПЖ (рак поджелудочной железы), РПрЖ (рак предстательной железы), ПКК (почечно-клеточная карцинома), МРЛ (мелкоклеточный рак легких), КМП (карцинома мочевого пузыря) и РЭМ (рак эндометрия матки) в частности. Также существует необходимость идентифицировать факторы, представляющие собой биомаркеры рака в целом и острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцеллюлярной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, рака пищевода-желудочного перехода, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легких, карциномы мочевого пузыря и рака эндометрия матки в частности, что позволит лучше ставить диагноз, составлять прогноз и предсказывать успех лечения.

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

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

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

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

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

ранее толерантность. Известными примерами ТАА этого класса являются Her-2/нец, сурвивин, теломераза или WT1.

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

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

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

Большая часть протеома человека образована из неканонических ресурсов, таких как альтернативные открытые рамки считывания (altORF (Vanderperre et al., 2013)),

эндогенные ретровирусные элементы, или включает этапы дополнительного посттранскрипционного (альтернативный сплайсинг РНК (Nilsen and Graveley, 2010)) или посттрансляционного процессирования (посттрансляционные модификации (Khoury et al., 2011), протеасомный сплайсинг (Liere et al., 2016)). Эта часть протеома представляет собой богатый источник ТАА, поскольку многие клеточные процессы, участвующие в выработке данных неканонических белков и пептидов, в раковых клетках часто имеют измененный вид (Laumont and Perreault, 2018).

Многие из информационных РНК (мРНК) содержат, кроме референсной открытой рамки считывания (ORF), нетрадиционные альтернативные открытые рамки считывания (altORF, (de Klerk and 't Hoen, 2015)). Эти дополнительные кодирующие последовательности могут варьироваться по размеру от нескольких, обычно менее 100 (малые открытые рамки считывания; sORF (Olexiouk et al., 2016)), до нескольких сотен кодонов и могут быть расположены перед, после или даже перекрывая референсную ORF. Трансляция данных altORF производится с различных сайтов инициации трансляции и может происходить в рамке считывания, отличающейся от референсной ORF. Присутствие малых открытых рамок считывания не ограничивается мРНК, о них сообщалось также в связи с другими регуляторными РНК, которые раньше считались не кодирующими (нкРНК, (Nam et al., 2016)). Ряд длинных не кодирующих РНК (днкРНК) и микроРНК, как было продемонстрировано, кодирует и активно участвует в трансляции малых пептидов (Anderson et al., 2015; Aspden et al., 2014).

На долю эндогенных ретровирусов человека (HERV) приходится значительная доля (~8%) человеческого генома. Эти вирусные элементы интегрировались в геном миллионы лет назад и с тех пор передавались поколениями вертикальным путем. Абсолютное большинство вирусов HERV потеряло функциональную активность вследствие мутации или усечения, тем не менее некоторые эндогенные ретровирусы, как, например, члены клада HERV-K, до сих пор кодируют функциональные гены и, как было показано, образуют подобные ретровирусу

частицы (Subramanian et al., 2011). Транскрипция провирусов HERV контролируется эпигенетически и при нормальных физиологических условиях находится в подавленном состоянии. Тем не менее сообщалось о реактивации и избыточной экспрессии, приводящей к активной трансляции вирусных белков при определенных заболеваниях, и в особенности в случае различных видов рака (Gonzalez-Cao et al., 2016; Kassiotis and Stoye, 2017). Данная опухолеспецифическая экспрессия образованных из HERV белков может быть использована в различных видах раковой иммунотерапии (Krishnamurthy et al., 2015; Schiavetti et al., 2002).

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

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

Молекулы МНС I класса встречаются на большинстве клеток, имеющих ядро. Они презентуют пептиды, образующиеся при протеолитическом расщеплении преимущественно эндогенных белков, дефектных рибосомных продуктов (DRIP) и более крупных пептидов. Однако пептиды, образованные из эндосомальных компартментов или экзогенных источников, также часто встречаются на молекулах МНС I класса. Этот неклассический способ презентации I классом в литературе

называется кросс-презентацией. (Brossart and Bevan, 1997; Rock et al., 1990). Молекулы МНС II класса могут встречаться преимущественно на профессиональных антигенпрезентирующих клетках (АПК) и, в первую очередь, презентировать пептиды экзогенных или трансмембранных белков, которые поглощаются АПК, например, во время эндоцитоза и впоследствии процессируются.

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

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

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

Удлиненные (более длинные) пептиды по изобретению могут выступать в качестве активных эпитопов МНС II класса.

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

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

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

Так как оба вида ответов, зависящие от CD8 и от CD4, вносят свой вклад в противоопухолевый эффект сообща и синергически, то идентификация и

характеристика опухолеассоциированных антигенов, распознаваемых как CD8+ Т-клетками (лиганд: молекула МНС I класса + пептидный эпитоп), так и CD4-положительными хелперными Т-клетками (лиганд: молекула МНС II класса + пептидный эпитоп) являются важными при разработке противоопухолевых вакцин.

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

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

Для того чтобы белки были распознаны Т-лимфоцитами в качестве опухолеспецифических или –ассоциированных антигенов, и чтобы они могли использоваться в терапии, должны выполняться особые предварительные требования. Антиген должен экспрессироваться преимущественно опухолевыми клетками и не экспрессироваться или экспрессироваться в сравнительно малом количестве здоровыми тканями. В предпочтительном варианте осуществления пептид должен избыточно презентироваться опухолевыми клетками по сравнению с нормальными здоровыми тканями. Кроме того, желательно, чтобы соответствующий антиген не только присутствовал в каком-либо виде опухоли, но и также имел высокую концентрацию (т. е. несколько копий соответствующего

пептида на клетку). Опухолеспецифические и опухолеассоциированные антигены часто образованы из белков, напрямую задействованных в трансформации нормальной клетки в опухолевую, в связи с их функцией, например, при контроле клеточного цикла или подавлении апоптоза. Кроме того, нисходящие мишени белков, напрямую являющихся причиной трансформации, могут быть представлены в повышенном количестве и, таким образом, быть косвенно опухолеассоциированными. Такие косвенно опухолеассоциированные антигены могут также быть мишенями вакцинационного подхода (Singh-Jasuja et al., 2004). Необходимо, чтобы эпитопы присутствовали в аминокислотной последовательности антигена, чтобы гарантировать, что такой пептид («иммуногенный пептид»), образованный из опухолеассоциированного антигена, ведет к Т-клеточному ответу *in vitro* или *in vivo*.

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

Поэтому антигены ТАА являются отправной точкой для разработки терапии на основе Т-клеток, включающей противоопухолевые вакцины, но не ограничивающейся ими. Методы идентификации и определения характеристики ТАА обычно основаны на использовании Т-клеток, которые могут быть выделены из организма пациентов или здоровых субъектов, или же они могут быть основаны на генерировании различающихся транскрипционных профилей или различающихся паттернов экспрессии пептидов между опухолевыми и нормальными тканями. Однако идентификация генов, избыточно экспрессированных в опухолевых тканях или человеческих опухолевых клеточных линиях или же селективно экспрессированных в таких тканях или клеточных линиях, не дает точной информации об использовании антигенов, транскрибированных с данных генов, в иммунотерапии. Это обусловлено тем, что

только отдельная субпопуляция эпитопов этих антигенов подходит для такого применения, так как Т-клетка с соответствующим ТКР должна быть в наличии, и необходимо, чтобы отсутствовала или была минимальной иммунологическая толерантность к этому конкретному эпитопу. Поэтому в наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения важно выбрать только те пептиды, презентруемые в избытке или селективно, против которых может быть обнаружена функциональная и/или пролиферирующая Т-клетка. Такая функциональная Т-клетка определяется как Т-клетка, которая при стимуляции специфическим антигеном может быть распространена посредством клонирования и способна к выполнению эффекторных функций («эффекторная Т-клетка»).

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

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В первом аспекте настоящее изобретение относится к пептиду, включающему аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 101, или его варианту, который по меньшей мере на 77%, предпочтительно, по меньшей мере на 88% гомологичен (предпочтительно, по меньшей мере на 77% или по меньшей мере на 88% идентичен) последовательности с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 101, где указанный вариант связывается с МНС и/или индуцирует Т-клеточную перекрестную реакцию с указанным пептидом, или его фармацевтически приемлемой соли, где указанный пептид не является базовым полипептидом полной длины.

Настоящее изобретение относится далее к пептиду по настоящему изобретению, включающему последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID No. 1 по SEQ ID NO 101, или его варианту, который

по меньшей мере на 77%, предпочтительно, по меньшей мере на 88% гомологичен (предпочтительно, по меньшей мере на 77% или по меньшей мере на 88% идентичен) последовательности с SEQ ID No. 1 по SEQ ID NO 101, где указанный пептид или его вариант обладает общей длиной, составляющей 8–100, предпочтительно 8–30 и, наиболее предпочтительно, 8–14 аминокислот.

В последующих таблицах представлены пептиды в соответствии с настоящим изобретением, соответствующие им SEQ ID NO. и потенциальные исходные (лежащие в основе) гены для данных пептидов. Пептиды в Таблице 3 являются пептидами, которые образованы из так называемых «альтернативных» или «коротких» открытых рамок считывания. Для каждой последовательности пептида представлен один иллюстративный идентификационный номер исходного транскрипта (идентификации согласно банку данных Ensemble (Aken et al., 2016) или RefSeq (O'Leary et al., 2016)). Кроме того, пептиды могут быть образованы из других дополнительных или альтернативных транскриптов, не указанных в данном документе.

В Таблице 3 пептиды с последовательностями с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 71 связываются с HLA-A*02. Пептиды в Таблице 4 являются пептидами, которые образованы из эндогенных ретровирусов человека. Для каждого пептида в качестве примера представлена одна хромосомная позиция. Пептиды, кроме того, могут быть картированы на дополнительные или альтернативные участки хромосом, не обозначенные в данном документе. В Таблице 4 пептиды с последовательностью с SEQ ID No. 72 по SEQ ID No. 74 связываются с HLA-A*02, пептиды с последовательностью с SEQ ID No. 75 по SEQ ID No. 95 связываются с различными молекулами HLA I класса (см. аллель HLA). Пептиды в Таблице 5 являются пептидами без прямого соответствия в человеческом геноме. В Таблице 5 пептиды с последовательностями с SEQ ID NO: 96 по SEQ ID NO: 101 связываются с HLA-A*02.

Таблица 3: Пептиды в соответствии с изобретением из альтернативных или коротких открытых рамок считывания.

SEQ ID No.	Последовательность	Код пептида	Идент.№ иллюстративного исходного транскрипта
1	KLLDFSTRI	NUDCD2-001	ENST00000521797
2	ALLDVLVKL	COLPDG-001	ENST00000225964
3	FLLVPSPIWQL	altORF-001	ENST00000430553
4	YLGDSHVLL	altORF-002	ENST00000356971
5	LVWEVVESV	altORF-003	ENST00000425076
6	ALHDSPVYL	altORF-004	ENST00000584912
7	ALWEEVKATSL	altORF-005	ENST00000361298
8	ILQSLVPAA	altORF-006	ENST00000595125
9	FLQEGDLISV	altORF-007	ENST00000463488
10	SLLDKLSGI	altORF-008	ENST00000374472
11	ALLPHAPEAV	altORF-009	ENST00000621654
12	HLDSMNVSI	altORF-010	ENST00000558088
13	FLDEGSLRL	altORF-011	ENST00000484411
14	LLIEVSEEL	altORF-012	ENST00000561317
15	NLVMPLLHI	altORF-013	ENST00000326799
16	ALLDAEQSPVAL	altORF-014	ENST00000559705
17	VLWDLRPSSLI	altORF-015	ENST00000503454
18	KMMTFFQGL	altORF-016	ENST00000559195
19	MLLPWLPKL	altORF-017	ENST00000568176
20	VLISLPGKV	altORF-018	ENST00000342308
21	FVFISPSFL	altORF-019	ENST00000579991

SEQ ID No.	Последовательность	Код пептида	Идент.№ иллюстративного исходного транскрипта
22	SLYDVPVGA	altORF-020	ENST00000540839
23	GLEVLDALL	altORF-021	ENST00000344922
24	TLTSLNILL	altORF-022	ENST00000451303
25	ISVLNLSAI	altORF-023	ENST00000490069
26	KLWTSLVNL	altORF-024	ENST00000513284
27	IAAGVPNTDA	altORF-025	ENST00000447802
28	SQLEKPETA	altORF-026	ENST00000412585
29	LLWEFPSMA	altORF-027	ENST00000465527
30	LLRLTLLPL	altORF-028	XM_005265671
31	VVLPIVITL	altORF-029	ENST00000335507
32	VLSVSAVLGA	altORF-030	ENST00000414310
33	FASERPPSV	altORF-031	ENST00000617924
34	LLNVEPAGA	altORF-032	ENST00000525179
35	VLLNSNYPV	altORF-033	ENST00000433310
36	FQVTRTTGV	altORF-034	ENST00000406361
37	KILDEFYNV	altORF-035	ENST00000464456
38	SLSAWLPSL	altORF-036	ENST00000430083
39	YIYEDEVRL	altORF-037	ENST00000603198
40	FTLPFLVNL	altORF-038	ENST00000522371
41	LMASEGIWESSL	altORF-039	ENST00000233242
42	WITPVIPAL	altORF-040	ENST00000421212
43	AIWSTILIA	altORF-041	ENST00000420453

SEQ ID No.	Последовательность	Код пептида	Идент.№ иллюстративного исходного транскрипта
44	WLIPRQLAAA	altORF-042	ENST00000367145
45	ALYHQSPLL	altORF-043	ENST00000555447
46	AMVEIIPKV	altORF-044	ENST00000425544
47	ALLPGVPGL	altORF-045	ENST00000434646
48	MLAEIHPKA	altORF-046	ENST00000558952
49	FLWDPRDVVL	altORF-047	ENST00000491641
50	GLASYLDRV	altORF-048	ENST00000411618
51	GLLTQVHIL	altORF-049	ENST00000521282
52	LAFVSHVLI	altORF-050	ENST00000361835
53	TISISLSSV	altORF-051	ENST00000254627
54	GLSPDQVFL	altORF-052	ENST00000394904
55	MVQQEKLFV	altORF-053	ENST00000611855
56	IITNLIVNI	altORF-054	ENST00000263321
57	YVLMTSLLL	altORF-055	ENST00000414195
58	MIISHRALEL	altORF-056	ENST00000452840
59	LAASTTFLGV	altORF-057	ENST00000605962
60	LLLATLENL	altORF-058	ENST00000484275
61	VLPWQPLLL	altORF-059	ENST00000492470
62	SLLGKPGLTI	altORF-060	ENST00000359318
63	LSFKRSLSI	altORF-061	ENST00000469017
64	LLLALRLSL	altORF-062	ENST00000375105
65	IAISQLTFV	altORF-063	ENST00000473984

SEQ ID No.	Последовательность	Код пептида	Идент.№ иллюстративного исходного транскрипта
66	ILNELLNSI	altORF-064	ENST00000505646
67	ALKELMGPA	altORF-065	ENST00000308370
68	KLLADAFKV	altORF-066	ENST00000569593
69	LLCPVVLQL	altORF-067	ENST00000497492
70	LLLQIEPAA	altORF-068	ENST00000624543
71	WLMPVMPAL	altORF-069	ENST00000473202

Таблица 4: Дополнительные пептиды в соответствии с изобретением из эндогенных ретровирусов человека.

SEQ ID No.	Последовательность	Код пептида	Аллели HLA	Иллюстративная хромосомная позиция
72	YLSFIKILL	HERVK-001	A*02	GRCh38:3:1:198295559:1 Позиция: 75551556-75551582
73	STTIINLIL	HERVK-002	A*02	GRCh38:22:1:50818468:1 Позиция: 18946733-18946759
74	TLLSYSIPL	HERVK-003	A*02	GRCh38:19:1:58617616:1 Позиция: 58312367-58312399
75	TTQEA EKLLER	HERVK-004	A*68 /A*03	GRCh38:19:1:58617616:1 Позиция: 58312301-58312330
76	TEQGPTGVTM	HERVK-005	B*40/B*44/B*49	GRCh38:3:1:198295559:1 Позиция: 101694496-101694528
77	VPAGVDVITEY	HERVK-006	A*29/B*35/B*07	GRCh38:19:1:58617616:1 Позиция: 58312250-58312276
78	GLLPPVRAM	HERVK-007	B*15	GRCh38:22:1:50818468:1 Позиция: 23540302-23540328
79	KIQDPGTAF	HERVK-008	A*03	GRCh38:8:1:145138636:1 Позиция: 42918854-42918828
80	RDQIVTVSV	HERVK-009	B*41/B*44	GRCh38:7:1:159345973:1 Позиция: 4587989-4587954
81	SLLGAATVEPPK	HERVK-010	A*03	GRCh38:6:1:170805979:1 Позиция: 28690343-28690369
82	LAPQMIAL	HERVK-011	B*15/B*51	GRCh38:7:1:159345973:1 Позиция: 141755441-141755418
83	KPRGPTPL	HERVK-012	B*08	GRCh38:20:1:64444167:1 Позиция: 32723848-32723877
84	RLCPAAPSEK	HERVK-013	A*03	GRCh38:20:1:64444167:1 Позиция: 32717605-32717631

SEQ ID No.	Последовательность	Код пептида	Аллели HLA	Иллюстративная хромосомная позиция
85	VYLLTFPPL	UNKN-007	A*24	GRCh38:10:1:133797422:1 Позиция: 6825699-6825676
86	LMIGKRIL	HERVK-014	B*08	GRCh38:4:1:190214555:1 Позиция: 9130103-9130138
87	LNLVSETEAMVK	HERVK-015	A*11 (A*03)	GRCh38:1:1:248956422:1 Позиция: 150635421-150635392
88	DEQETDAFL	HERVK-016	B*18/B*44	GRCh38:6:1:170805979:1 Позиция: 77721912-77721889
89	MIFYVLQK	HERVK-017	A*03	GRCh38:4:1:190214555:1 Позиция: 190112774-190112748
90	YLRDFKIKR	HERVK-018	A*31 (A*03)	GRCh38:4:1:190214555:1 Позиция: 190107560-190107534
91	SSHFILVTF	HERVK-019	A*24	GRCh38:3:1:198295559:1 Позиция: 75556001-75556027
92	ELVAVTSVL	HERVK-020	B*13	GRCh38:8:1:145138636:1 Позиция: 145025405-145025379
93	WQKNSMRL	HERVK-021	B*15	GRCh38:20:1:64444167:1 Позиция: 34135051-34135074
94	MGRRRNLY	HERVK-022	B*15	GRCh38:4:1:190214555:1 Позиция: 165000827-165000850
95	QVKIVTLL	HERVK-023	B*52	GRCh38:12:1:133275309:1 Позиция: 34627138-34627115

Таблица 5: Дополнительные пептиды в соответствии с изобретением без прямого соответствия в человеческом геноме в соответствии с настоящим изобретением.

SEQ ID No.	Последовательность	Код пептида
96	KIIEDLANTV	KRT18-001
97	GLIDDKGTIKL	CDC2-006
98	SLMEVTHDL	LARS-001
99	ALMDGSESRFFV	BSG-001
100	SLGPPVGV	CIZ1-001
101	KLPEGHLPEV	AHNAK2-003

Таблица 6: Пептиды в соответствии с изобретением, полезные, например, для персонализированной противораковой терапии.

SEQ ID No.	Последовательность	Код пептида
102	GLDPTQFRV	POLA1-003
103	SLVSYLDKV	KRT16P-001

Неожиданно было обнаружено, в контексте настоящего изобретения, что альтернативные открытые рамки считывания являются источником эффективных опухолеассоциированных антигенов. До сих пор имеется лишь малое число сообщений, описывающих такие антигены, например, образованных из gp75 (Wang et al., Utilization of an alternative open reading frame of a normal gene in generating a novel human cancer antigen. *J Exp Med.* 1996 Mar 1;183(3):1131-40), и NY-ESO-1/LAGE-1 ORF2 (Mandic, et al., The alternative open reading frame of LAGE-1 gives rise to multiple promiscuous HLA-DR-restricted epitopes recognized by T-helper 1-type tumor-reactive CD4+ T cells, *Cancer Res.* 2003 Oct 1;63(19):6506-15). В равной степени, лишь в небольшом числе сообщений обсуждаются эндогенные ретровирусные (HERV) последовательности в качестве фактического источника опухолеассоциированных антигенов (Mullins CS and Linnebacher M. Endogenous retrovirus sequences as a novel class of tumor-specific antigens: an example of HERV-H env encoding strong CTL epitopes. *Cancer Immunol Immunother.* 2012 Jul;61(7):1093-100; and Attermann AS, et al., Human endogenous retroviruses and their implication for immunotherapeutics of cancer. *Ann Oncol.* 2018 Nov 1;29(11):2183-2191). HERV были предложены в качестве «внутреннего адъюванта», возможно, повышающего чувствительность раковых клеток к иммунологическому распознаванию, или в качестве аутоантигена, который может индуцировать аутоиммунитет при психоневрологических заболеваниях, таких как множественный склероз и шизофрения (Tu X, et al., Human leukemia antigen-A*0201-restricted epitopes of human endogenous retrovirus W family envelope (HERV-W env) induce strong cytotoxic T lymphocyte responses. *Virol Sin.* 2017 Aug;32(4):280-289).

Настоящее изобретение, кроме того, относится в общем к пептидам в соответствии с настоящим изобретением для применения при лечении пролиферативных заболеваний, таких как, например, острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, рака пищеводно-желудочного перехода, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного

рака легких, рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака, рака мочевого пузыря и рака эндометрия матки.

Особенно предпочтительными являются пептиды – в отдельности или в комбинации – в соответствии с настоящим изобретением, выбранные из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 101. Более предпочтительными являются пептиды – в отдельности или в комбинации – выбранные из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 14, с SEQ ID No. 72 по SEQ ID No. 81, с SEQ ID No. 96 по SEQ ID No. 101 (см. Таблицу 3, Таблицу 4 и Таблицу 5), и их применение в иммунотерапии острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, рака пищеводно-желудочного перехода, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легких, карциномы мочевого пузыря и рака эндометрия матки.

Таким образом другой аспект настоящего изобретения относится к применению пептидов в соответствии с настоящим изобретением для – предпочтительно комбинированного – лечения пролиферативного заболевания, выбранного из группы: острый миелоидный лейкоз, рак молочной железы, холангиоцелочная карцинома, хронический лимфоцитарный лейкоз, колоректальный рак, рак желчного пузыря, глиобластома, рак желудка, рак пищеводно-желудочного перехода, гепатоклеточная карцинома, плоскоклеточная карцинома головы и шеи, меланома, неходжкинская лимфома, немелкоклеточный рак легких, рак яичника, рак пищевода, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечно-клеточная карцинома, мелкоклеточный рак легких, карцинома мочевого пузыря и рак эндометрия матки.

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

Настоящее изобретение далее относится к пептидам в соответствии с настоящим изобретением, где указанные пептиды (каждый из них) состоят или состоят по существу из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 101.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Настоящее изобретение далее относится к способу в соответствии с настоящим изобретением, где антигенпрезентирующая клетка включает вектор экспрессии, способный экспрессировать или экспрессирующий указанный пептид, содержащий последовательности с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 101, предпочтительно содержащий последовательности с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 14, с SEQ ID No. 72 по SEQ ID No. 81, с SEQ ID No. 96 по SEQ ID No. 101 или вариантную аминокислотную последовательность.

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

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

Настоящее изобретение далее относится к применению любого описанного пептида, нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, вектора экспрессии в соответствии с настоящим изобретением, клетки в соответствии с настоящим изобретением, активированного Т-лимфоцита, Т-клеточного рецептора или антитела или других молекул, связывающихся с пептидом и/или комплексом

пептид-МНС в соответствии с настоящим изобретением в качестве медикамента или в производстве медикамента. Предпочтительно, если указанный медикамент обладает активным противораковым действием.

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

Настоящее изобретение относится далее к применению в соответствии с настоящим изобретением, где указанные раковые клетки являются клетками острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, рака пищеводно-желудочного перехода, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легких, карциномы мочевого пузыря и рака эндометрия матки, и предпочтительно клетками острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, рака пищеводно-желудочного перехода, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легких, карциномы мочевого пузыря и рака эндометрия матки.

Настоящее изобретение относится далее к биомаркерам на основе пептидов в соответствии с настоящим изобретением, в настоящем документе называемым «мишенями», которые могут быть использованы при постановке диагноза рака, предпочтительно острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы,

холангиоцеллюлярной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, рака пищевода-желудочного перехода, гепатоцеллюлярной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легких, карциномы мочевого пузыря и рака эндометрия матки. В роли маркера может выступать избыточная презентация самого(их) пептида(ов) или избыточная экспрессия соответствующего(их) гена(ов). Эти маркеры могут также использоваться для предсказания вероятности успеха лечения, предпочтительно иммунотерапии, и, наиболее предпочтительно, иммунотерапии, направленной на ту же мишень, которая была идентифицирована биомаркером. Например, для окрашивания срезов опухоли для выявления присутствия интересующего пептида в комплексе с МНС может использоваться антитело или растворимый ТКР.

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

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

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

Специфические элементы клеточных иммунных ответов способны к специфическому распознаванию и уничтожению опухолевых клеток. Выделение Т-

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

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

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

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

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

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

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

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

«иммуноген» будет представлять собой молекулу, которая способна индуцировать иммунный ответ, и, в случае настоящего изобретения, молекулу, способную индуцировать Т-клеточный ответ. В другом аспекте иммуноген может быть пептидом, комплексом пептида и МНС, олигопептидом и/или белком, используемым для получения специфических антител или ТКР против него.

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

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

Таблица 7: Значения частоты экспрессии F для серотипов HLA-A*02, HLA-A*01, HLA-A*03, HLA-A*24, HLA-B*07, HLA-B*08 и HLA-B*44. Частоты встречаемости гаплотипов Gf получены из исследования, в котором использовались данные HLA-типирования из реестра для более чем 6,5 миллионов доноров-добровольцев из США (Gragert et al., 2013). Частота гаплотипа - это частота обособленного аллеля на отдельной хромосоме. В связи с диплоидным набором хромосом в клетках млекопитающих частота встречаемости этого аллеля в генотипе выше и может быть рассчитана при помощи принципа Харди-Вайнберга ($F = 1 - (1-Gf)^2$).

Аллель	Популяция	Рассчитанный фенотип по частоте аллеля (F)
A*02	Афроамериканцы (N=28557)	32,3%

	Белые европейцы (N=1242890)	49,3%
	Японцы (N=24582)	42,7%
	Латиноамериканцы, Юж. + Центр. Амер. (N=146714)	46,1%
	Юго-восточные азиаты (N=27978)	30,4%
A*01	Афроамериканцы (N=28557)	10,2%
	Белые европейцы (N=1242890)	30,2%
	Японцы (N=24582)	1,8%
	Латиноамериканцы, Юж. + Центр. Амер. (N=146714)	14,0%
	Юго-восточные азиаты (N=27978)	21,0%
A*03	Афроамериканцы (N=28557)	14,8%
	Белые европейцы (N=1242890)	26,4%
	Японцы (N=24582)	1,8%
	Латиноамериканцы, Юж. + Центр. Амер. (N=146714)	14,4%
	Юго-восточные азиаты (N=27978)	10,6%
A*24	Афроамериканцы (N=28557)	2,0%
	Белые европейцы (N=1242890)	8,6%
	Японцы (N=24582)	35,5%
	Латиноамериканцы, Юж. + Центр. Амер. (N=146714)	13,6%
	Юго-восточные азиаты (N=27978)	16,9%
B*07	Афроамериканцы (N=28557)	14,7%
	Белые европейцы (N=1242890)	25,0%
	Японцы (N=24582)	11,4%
	Латиноамериканцы, Юж. + Центр. Амер. (N=146714)	12,2%
	Юго-восточные азиаты (N=27978)	10,4%
B*08	Афроамериканцы (N=28557)	6,0%
	Белые европейцы (N=1242890)	21,6%
	Японцы (N=24582)	1,0%

	Латиноамериканцы, Юж. + Центр. Амер. (N=146714)	7,6%
	Юго-восточные азиаты (N=27978)	6,2%
В*44	Афроамериканцы (N=28557)	10,6%
	Белые европейцы (N=1242890)	26,9%
	Японцы (N=24582)	13,0%
	Латиноамериканцы, Юж. + Центр. Амер. (N=146714)	18,2%
	Юго-восточные азиаты (N=27978)	13,1%

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

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

Таблица 8: Охват HLA-аллелем популяции европеоидной расы (рассчитано в соответствии с (Gragert et al., 2013)).

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

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

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

В контексте настоящего описания понятие «нуклеотид, кодирующий пептид», относится к нуклеотидной последовательности, кодирующей пептид, включая искусственные (сделанные человеком) старт- и стоп-кодоны, совместимые с

биологической системой, которой должна экспрессироваться последовательность, например, дендритная клетка или другая клеточная система, пригодная для получения ТКР.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

композиции и все-таки могли быть выделены, так что такой вектор или композиция не является частью своего естественного окружения.

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

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

обладает иммуногенной активностью), если он введен отдельно или факультативно с подходящим адъювантом или в векторе животному, такому как млекопитающее, например, кролику или мыши, также включая человека; причем такой иммунный ответ принимает форму стимуляции Т-клеточного ответа у животного-реципиента, такого как человек. Альтернативно «активный фрагмент» может также быть использован для инициации ответа Т-клетки *in vitro*.

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

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

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

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

- (i) каждое основание или аминокислота в Контрольной последовательности, которые не имеют соответствующего выравненного основания или аминокислоты в Сравняваемой 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 Сравняваемой 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 Сравняваемой последовательностью с любой брешью, образующейся в Контрольной последовательности, считающейся также за основание или аминокислоту.

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

Как было упомянуто выше, в настоящем изобретении, таким образом, предложен пептид, включающий последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 101 или ее вариант, который на 88% гомологичен последовательностям с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 101, или их варианту, который индуцирует перекрестную реакцию Т-клеток с указанным пептидом. Пептиды по изобретению обладают способностью связываться с

молекулой главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) I класса или – удлинённые версии упомянутых пептидов – с МНС II класса.

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

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

Под «вариантом» данной аминокислотной последовательности авторы изобретения имеют в виду, что боковые цепи, например, одного или двух аминокислотных остатков, изменены (например, путем их замещения боковой цепью остатка другой встречающейся в природе аминокислоты или какой-либо другой боковой цепью) так, что пептид по-прежнему способен связываться с молекулой HLA по существу таким же путем, как и пептид, состоящий из данной аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 101. Например, пептид может быть модифицирован таким образом, что он по меньшей мере сохранит, если не улучшит, способность взаимодействовать и связываться со связывающей бороздкой подходящей молекулы МНС, такой как HLA-A*02 или -DR,

и, таким образом, он по меньшей мере сохранит, если не улучшит, способность связываться с ТКР активированных Т-клеток.

Данные Т-клетки могут затем вступать в перекрестную реакцию с клетками и уничтожать клетки, которые экспрессируют полипептид, который содержит природную аминокислотную последовательность родственного пептида, как определено в аспектах этого изобретения. По информации из научной литературы и банков данных (Rammensee et al., 1999; Godkin et al., 1997), конкретные позиции связывающихся с HLA пептидов являются типичными якорными остатками, формирующими центральную последовательность, подходящую к соединительному элементу рецептора HLA, который определяется полярными, электрофизическими, гидрофобными и пространственными свойствами полипептидных цепей, образующих связывающую бороздку. Так, специалист данной области будет в состоянии модифицировать аминокислотные последовательности с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 101, сохраняя известные якорные остатки, и будет в состоянии определить, сохраняют ли такие варианты способность связываться с молекулами MHC I или II класса. Варианты по настоящему изобретению сохраняют способность связываться с ТКР активированных Т-клеток, которые могут впоследствии вступать в перекрестную реакцию и уничтожать клетки, экспрессирующие полипептид, который содержит природную аминокислотную последовательность родственного пептида, как определено в аспектах настоящего изобретения.

Исходные (немодифицированные) пептиды, раскрываемые в данном описании, могут быть модифицированы путем замены одного или нескольких остатков в различных, возможно отобранных, участках по длине пептидной цепи, если не заявлено иное. Предпочтительно, если такие замены расположены на конце аминокислотной цепи. Такие замены могут носить консервативный характер, например, когда одна аминокислота заменяется аминокислотой с похожей структурой и характеристиками, так же как при замене гидрофобной аминокислоты на другую гидрофобную аминокислоту. Еще более консервативной будет замена

аминокислот одинакового или похожего размера и химического характера, как, например, при замене лейцина на изолейцин. В исследованиях вариаций последовательностей внутри семейств встречающихся в природе гомологичных белков определенные замены аминокислот допускаются чаще, чем другие, и они часто связаны со сходствами по размеру, заряду, полярности и гидрофобности между исходной аминокислотой и ее заменой; и таковой является основа определения «консервативных замен».

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

В одном аспекте консервативные замены могут включать те, что описаны Dayhoff в работе «The Atlas of Protein Sequence and Structure. Vol. 5», *Natl. Biomedical Research*, содержание которой в полном объеме включено путем ссылки. Например, в одном аспекте аминокислоты, которые относятся к одной из следующих групп, могут быть заменены на другие, что представляет собой консервативную замену: Группа 1: аланин (A), пролин (P), глицин (G), аспарагин (N), серин (S), треонин (T); группа 2: цистеин (C), серин (S), тирозин (Y), треонин (T); группа 3: валин (V), изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), аланин (A), фенилаланин (F); группа 4: лизин (K), аргинин (R), гистидин (H); группа 5: фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W), гистидин (H); и группа 6: аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E). В одном аспекте консервативная аминокислотная замена может быть выбрана из следующих T→A, G→A, A→I, T→V, A→M, T→I, A→V, T→G, и/или T→S.

В одном аспекте консервативная аминокислотная замена может включать замену одной аминокислоты на другую аминокислоту из одного и того же класса, например, (1) неполярные: Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp; (2) незаряженные полярные: Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln; (3) кислые: Asp, Glu; и (4) основные: Lys, Arg, His. Другие консервативные аминокислотные замены могут быть осуществлены по следующему принципу: (1) ароматические: Phe, Tyr, His; (2) доноры протонов: Asn, Gln, Lys, Arg, His, Trp; и (3) акцепторы протонов: Glu, Asp, Thr, Ser, Tyr, Asn, Gln (см., например, патент США № 10 106 805, содержание которой в полном объеме включено путем ссылки).

В другом аспекте консервативные замены могут быть осуществлены в соответствии с таблицей А. Способы предсказания толерантности к белковой модификации могут быть взяты, например, из работы Guo и соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 101(25):9205-9210 (2004), содержание которой в полном объеме включено путем ссылки.

Таблица А:

Консервативные аминокислотные замены

Аминокислота	Замены (иные известны из уровня техники)
Ala	Ser, Gly, Cys
Arg	Lys, Gln, His
Asn	Gln, His, Glu, Asp
Asp	Glu, Asn, Gln
Cys	Ser, Met, Thr
Gln	Asn, Lys, Glu, Asp, Arg
Glu	Asp, Asn, Gln
Gly	Pro, Ala, Ser
His	Asn, Gln, Lys
Ile	Leu, Val, Met, Ala
Leu	Ile, Val, Met, Ala
Lys	Arg, Gln, His
Met	Leu, Ile, Val, Ala, Phe
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp, His
Ser	Thr, Cys, Ala
Thr	Ser, Val, Ala
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, His
Val	Ile, Leu, Met, Ala, Thr

В другом аспекте консервативные замены могут быть такими, как показано в Таблице Б под заголовком «Консервативные замены». Если такие замены приводят в результате к изменениям в биологической активности, тогда могут быть произведены дополнительные существенные изменения, названные под заголовком «Примеры замен» в Таблице Б, и при необходимости проведен скрининг продуктов.

Таблица Б

Аминокислотные замены

Исходный остаток (встречающаяся в природе аминокислота)	Консервативные аминокислотные замены	Примеры замен
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Норлейцин
Leu (L)	Ile	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Норлейцин

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

могут неожиданно привести к благоприятным эффектам, не предсказуемым исходя из обычных химических принципов.

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

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

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

или подвергнута негативному влиянию по сравнению с немодифицированным пептидом.

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

Таблица 9: Варианты и мотив пептида в соответствии с SEQ ID NO: 4, 8, 72, 74, 96 и 97

Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
SEQ ID No 4	Y	L	G	D	S	H	V	L	L		
Вариант									V		
									I		
									A		
		M							V		
		M							I		
		M									
		M							A		
		A							V		
		A							I		
		A									
		A							A		
		V							V		
		V							I		
		V									
		V							A		
		T							V		
		T							I		
		T									
	T							A			
	Q							V			

		Q							I		
		Q									
		Q							A		
Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
SEQ ID No 8	I	L	Q	S	L	V	P	A	A		
Вариант									V		
									I		
									L		
		M							V		
		M							I		
		M							L		
		M									
		A							V		
		A							I		
		A							L		
		A									
		V							V		
		V							I		
		V							L		
		V									
		T							V		
		T							I		
		T							L		
		T									
		Q							V		
	Q							I			
	Q							L			
	Q										
Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
SEQ ID No 72	Y	L	S	F	I	K	I	L	L		
Вариант									V		
									I		
									A		
		M							V		
		M							I		
		M									
		M							A		
		A							V		

	A								A
	V								V
	V								I
	V								
	V								A
	T								V
	T								I
	T								
	T								A
	Q								V
	Q								I
	Q								
	Q								A

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

Пептиды по изобретению могут быть удлинены с помощью вплоть до четырех аминокислот, это значит, что 1, 2, 3 или 4 аминокислоты могут быть добавлены к одному из концов в любой комбинации, представленной между 4:0 и 0:4. Комбинации элонгаций в соответствии с изобретением могут быть взяты из Таблицы 10.

Таблица 10: Комбинации элонгаций пептидов по изобретению

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

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

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

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

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

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

Разумеется, пептид или вариант в соответствии с настоящим изобретением будет обладать способностью связываться с молекулой главного комплекса

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

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

В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения пептид состоит или по существу состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 101.

«Состоит по существу из» подразумевает, что пептид в соответствии с настоящим изобретением, помимо любой из последовательностей с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 101, или его вариант, содержит дополнительные находящиеся на N- и/или С-конце фрагменты последовательности аминокислот, которые не являются обязательно формирующими часть пептида, которая функционирует как эпитоп для молекул МНС.

Тем не менее, эти фрагменты могут быть важны для обеспечения эффективного введения пептида в соответствии с настоящим изобретением в клетки. В одном варианте осуществления настоящего изобретения пептид является частью слитого белка, которая включает, например, 80 N-терминальных аминокислот антиген-ассоциированной инвариантной цепи (р33, в дальнейшем «Ii») HLA-DR, как взятый из банка данных NCBI, инвентарный номер - GenBank Accession-number X00497. В

других видах слияния пептиды по настоящему изобретению могут быть слиты с антителом, описанным в настоящем документе, или его функциональной частью, в частности встроены в последовательность антитела, так чтобы быть специфической мишенью указанного антитела, или, например, слиты с или встроены в антитело, являющееся специфичным для дендритных клеток, описанных в настоящей заявке.

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

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

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

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

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

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

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

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

Распространено также избирательное восстановление дисульфидных связей в белках. Дисульфидные связи могут быть образованы и окислены во время тепловой обработки биофармацевтических средств. К-реагент Вудворда может использоваться для модификации определенных остатков 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, например, с помощью йодацетамида, бромэтиламина и хлорамина T.

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

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

Успешная модификация терапевтических белков и пептидов ПЭГ (полиэтиленгликолем) часто связана с увеличением полупериода циркуляции, тогда как поперечная сшивка белков 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.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к не встречающемуся в природе пептиду, где указанный пептид состоит или состоит по существу из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID No: 1 по SEQ ID NO: 101 и был получен синтетическим способом (например, синтезирован) в виде фармацевтически приемлемой соли. Способы синтетического получения пептидов хорошо известны в данной области. Соли пептидов в соответствии с настоящим изобретением существенно отличаются от пептидов по своему состоянию(ям) *in vivo*, так как синтезированные пептиды не являются солями *in vivo*. Не

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

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

осуществляется при использовании 20% пиперидина в N, N-диметилформамиде. Функциональные группы боковой цепи могут быть защищены получением таких соединений, как их бутиловые эфиры (в случае серина, треонина и тирозина), бутиловые сложные эфиры (в случае 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-акрилоилэтилендиамин (компонент для перекрестной сшивки, линкер) и метилового эфира акрилоилсаркозина (функционализирующий агент). Для образования легкорасщепляемой связи пептида и смолы используется нестойкое к действию кислот производное 4-гидроксиметилфеноксисульфоновой кислоты. Все аминокислотные производные добавляются в виде предварительно синтезированных симметричных ангидридных производных за исключением аспарагина и глютамина, которые добавляются с применением обратной реакции соединения, опосредованной N, N-дициклогексилкарбодиимид/1-гидроксibenзотриазолом. Все реакции сочетания и снятия защитных групп отслеживались с помощью методов контроля с применением нингидрина, тринитробензолсульфоновой кислоты или изотина. После завершения синтеза пептиды отщепляются от смолы-носителя с сопутствующим удалением защитных групп боковой цепи при обработке 95% трифторуксусной кислотой, содержащей 50 % смеси поглотителей. Обычно используемые поглотители включают этандитиол, фенол, анизол и воду, окончательный выбор зависит от составляющих аминокислот синтезируемого пептида. Также возможна комбинация твердофазных и жидкофазных методов синтеза пептидов (см., например, (Bruckdorfer et al., 2004), и прилагаемые ссылки).

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

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

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

В целях выбора презентруемых в избытке пептидов был рассчитан профиль презентации, позволяющий оценить медианное значение презентации образца, а также вариации повторных измерений. В профиле сравниваются образцы опухолевой формы, представляющей интерес, с фоновым уровнем образцов нормальной ткани. Каждый из этих профилей может быть затем консолидирован в показатель избыточной презентации путем расчета значения p по линейной модели со смешанными эффектами (Pinheiro et al., 2015), скорректировав ее для повторных анализов на уровень ложноположительных обнаружений (Benjamini and Hochberg, 1995)(ср. Пример 1, Фигуру 1).

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 в результате последовательности пептида подтверждали сравнением картины фрагментации природных опухолеассоциированных пептидов (TUMAP), записанной на образцах (N = 490 образцов) острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, рака пищевода-желудочного перехода, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легких, карциномы мочевого пузыря и рака эндометрия матки, с картинами фрагментации соответствующих синтетических контрольных пептидов с идентичными последовательностями. Поскольку пептиды были идентифицированы непосредственно в качестве лигандов молекул HLA первичных опухолей, то эти результаты дают прямое доказательство естественного процессирования и презентации идентифицированных пептидов на ткани первичной раковой опухоли, полученной от пациентов с острым миелоидным лейкозом, раком молочной железы, холангиоцелочной карциномой, хроническим лимфоцитарным лейкозом, колоректальным раком, раком желчного пузыря, глиобластомой, раком желудка, раком пищевода-желудочного перехода, гепатоклеточной карциномой, плоскоклеточной карциномой головы и шеи, меланомой, неходжкинской лимфомой, немелкоклеточным раком легких, раком яичника, раком пищевода, раком поджелудочной железы, раком предстательной железы, почечно-клеточной карциномой, мелкоклеточным раком легких, карциномой мочевого пузыря и раком эндометрия матки.

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

Дополнительная информация о последовательностях из общедоступных ресурсов (Olexiouk et al., 2016; Subramanian et al., 2011) была интегрирована в технологическую платформу XPRESIDENT®, чтобы обеспечить возможность идентификации TUMAP неканонического происхождения. Чтобы идентифицировать пептидную последовательность опухолеспецифических спектральных кластеров, как было определено с помощью XPRESIDENT®, в ортогональной стратегии поиска, не зависящей от банка данных, использовали секвенирование *de novo*. Благодаря этому могли быть идентифицированы новые пептиды TUMAP без прямого соответствия в человеческом геноме. Для каждого пептида и образца были подсчитаны уровни презентации, включающие оценки погрешности. Были идентифицированы пептиды, презентуемые исключительно на опухолевой ткани, и пептиды, избыточно презентуемые на опухолевых тканях в сравнении с не пораженными раком тканями и органами.

Комплексы HLA-пептид из образцов опухолевой ткани острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, рака пищеводно-желудочного перехода, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легких, карциномы мочевого пузыря и рака эндометрия матки, были очищены; HLA-ассоциированные пептиды были выделены и проанализированы методом ЖХ-МС (см. Пример 1). Все TUMAP, содержащиеся в настоящей патентной заявке, были идентифицированы с помощью этого подхода на образцах острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, рака пищеводно-желудочного перехода, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легких, карциномы мочевого пузыря и рака эндометрия матки, что подтверждает их презентацию на клетках острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, рака пищеводно-желудочного перехода, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легких, карциномы мочевого пузыря и рака эндометрия матки.

Пептиды TUMAP, идентифицированные на многочисленных тканях острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного

пузыря, глиобластомы, рака желудка, рака пищеводно-желудочного перехода, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легких, карциномы мочевого пузыря и рака эндометрия матки и на нормальных тканях, 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 банке данных белков, спектральная кластеризация, деконволюция состояния заряда (разряд) и выравнивание времени удерживания и нормализация.

Кроме того, технологическая платформа XPRESIDENT® позволяет проведение прямого абсолютного количественного определения уровня МНС-, предпочтительно HLA-рестриктированного, пептида на раковых или других инфицированных тканях. Вкратце, общее число клеток было подсчитано из общего содержания ДНК проанализированного образца ткани. Общее количество пептида TUMAP в образце ткани измеряли с помощью наноЖХ-МС/МС в виде соотношения природного пептида TUMAP и известного количества версии пептида TUMAP с изотопной меткой, так называемого внутреннего стандарта. Эффективность выделения пептида TUMAP определяли методом введения стандартной добавки комплекса пептид-МНС всех выбранных пептидов TUMAP в лизат ткани в самый ранний возможный момент процесса выделения пептида TUMAP и их обнаружением с помощью наноЖХ-МС/МС, за чем следовало завершение процедуры выделения пептида. Общее число клеток и общее количество пептида были подсчитаны по трем повторным измерениям на образец ткани. Пептид-

специфическую эффективность выделения подсчитывали как средний показатель из 9 экспериментов с введением стандартных добавок с тремя повторными измерениями для каждого (см. Пример 6 и Таблицу 15).

Кроме избыточной презентации пептида была исследована экспрессия мРНК исходного гена. Данные по мРНК, полученные с помощью секвенирования РНК (RNASeq) из нормальных тканей и раковых тканей (ср. Пример 2, Фигуру 2). Дополнительным источником данных о нормальных тканях служил общедоступный банк данных по экспрессии РНК из приблизительно 3000 образцов нормальных тканей (Lonsdale, 2013). Пептиды, которые получены из белков, которые кодируются мРНК, демонстрирующей высокую степень экспрессии в раковой ткани, но ее очень низкий уровень или отсутствие в жизненно важных нормальных тканях, были включены как предпочтительные в настоящее изобретение.

В настоящем изобретении предложены пептиды, которые пригодны для лечения раковых заболеваний / опухолей, предпочтительно острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, рака пищеводно-желудочного перехода, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легких, карциномы мочевого пузыря и рака эндометрия матки, которые презентируют в избытке или исключительно пептиды по изобретению. Как показал масс-спектрометрический анализ, эти пептиды естественно презентировались молекулами HLA на образцах первичного острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, рака пищеводно-желудочного перехода, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака

предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легких, карциномы мочевого пузыря и рака эндометрия матки человека.

Как было показано, многие из исходных генов/белков (называемых также «белками полной длины» или «базовыми белками»), из которых были получены пептиды, были в высокой степени избыточно экспрессированы в раковых тканях по сравнению с нормальными тканями – понятие «нормальные ткани» в связи с настоящим изобретением подразумевает здоровые клетки крови, головного мозга, сердца, печени, легких, жировой ткани, надпочечной железы, желчного протока, мочевого пузыря, костного мозга, пищевода, глаза, желчного пузыря, головы и шеи, толстой кишки, тонкой кишки, почки, лимфатического узла, центрального нерва, периферического нерва, поджелудочной железы, паращитовидной железы, брюшины, гипофиза, плевры, скелетных мышц, кожи, спинного мозга, селезенки, желудка, щитовидной железы, трахеи и мочеточника или клетки других нормальных тканей, что демонстрирует высокую степень ассоциации исходных генов с опухолью (см. Пример 2). Более того, сами пептиды в высшей степени избыточно презентуются на опухолевой ткани – понятие «опухолевая ткань» в связи с настоящим изобретением подразумевает образец от пациента, страдающего от острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, рака пищеводно-желудочного перехода, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легких, карциномы мочевого пузыря и рака эндометрия матки, но не на нормальных тканях (см. Пример 1).

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

молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, рака пищеводно-желудочного перехода, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легких, карциномы мочевого пузыря и рака эндометрия матки, презентирующие полученные пептиды.

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

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

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

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

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

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

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

антиген нагружен на тетрамеры МНС I или II класса путем тетрамеризации комплексов антиген-мономер МНС I или II класса.

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

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

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

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

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

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

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

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

ингредиентом, таким как радионуклид, химиотерапевтическим средством или токсином.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

В одном аспекте вакцина включает по меньшей мере один пептид, имеющий аминокислотную последовательность с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No 101, и по меньшей мере один дополнительный пептид, предпочтительно от двух до 50, более предпочтительно от двух до 25, еще более предпочтительно от двух до 20 и, наиболее предпочтительно, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать или восемнадцать пептидов. Пептид(ы) может(могут) быть получен(ы) из одного или более специфических ТАА и может(могут) связываться с молекулами MHC I класса.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Типичная клеточная векторная плазмида млекопитающих для конститутивной экспрессии включает промотор CMV или SV40 с подходящим концевым участком поли-А и маркером устойчивости, таким как неомицин. Одним примером является pSVL, имеющимся в наличии в компании Pharmacia, Пискатеуэй, Нью-Джерси, США. Примером индуцируемого вектора экспрессии млекопитающих является pMSG, также имеющийся в наличии в Pharmacia. Пригодными плазмидными векторами дрожжей являются pRS403-406 и pRS413-416, и они, как правило, имеются в наличии у компании Stratagene Cloning Systems, Ла 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, цитоплазматическую экспрессию или секрецию и N-терминальную или C-терминальную маркировку в различных комбинациях FLAG, 3xFLAG, с-тус или MAT. Данные слитые белки позволяют проводить выявление, очистку и анализ рекомбинантного белка. Слияния с двойной меткой обеспечивают гибкость при выявлении.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

В другом варианте осуществления пептид, нуклеиновая кислота или вектор экспрессии по изобретению применяются в медицине. Например, пептид или его вариант может приготавливаться для внутривенного (в/в) введения, подкожного (п/к) введения, внутрикожного (в/к) введения, внутрибрюшинного (в/б) введения, внутримышечного (в/м) введения. Предпочтительные способы введения пептидов включают п/к, в/к, в/б, в/м и в/в. Предпочтительные способы введения ДНК включают в/к, в/м, п/к, в/б и в/в. 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., 2012).

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

противоположного определяющего комплементарность участка CDR, как описывается выше.

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

полном объеме путем ссылки) и действуя как иммуноадъюванты (например, ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-23, ИЛ-7, ИНФ-альфа, ИНФ-бета) (Gabrilovich et al., 1996).

Об иммуностимулирующих олигонуклеотидах CpG также сообщалось, что они усиливают эффекты адъювантов в составе вакцин. Не желая быть связанными соответствием какой-либо конкретной теории, авторы полагают, что CpG-олигонуклеотиды при активации врожденной (не приобретенной) иммунной системы действуют с помощью Toll-подобных рецепторов (TLR), в основном, TLR9. Вызванная CpG активация TLR9 усиливает антиген-специфичные гуморальные и клеточные ответы на широкий спектр антигенов, включая пептидные или белковые антигены, живые или убитые вирусы, вакцины из дендритных клеток, аутологичные клеточные вакцины и полисахаридные конъюгаты как в профилактических, так и терапевтических вакцинах. Более важно то, что улучшается созревание и дифференциация дендритных клеток, приводя к повышенной активации клеток типа TH1 и интенсивной выработке цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) даже при отсутствии помощи со стороны CD4 Т-клеток. Активация TH1, вызванная стимуляцией TLR9, сохраняется даже в присутствии вакцинных адъювантов, таких как квасцы или неполный адъювант Фрейнда (IFA), которые обычно способствуют активации TH2. CpG-олигонуклеотиды проявляют даже бóльшую адъювантную активность, если они входят в состав или вводятся в организм вместе с другими адъювантами или в таких составах как микрочастицы, наночастицы, липидные эмульсии или в подобных составах, которые в особенности необходимы для инициации сильного ответа, если антиген относительно слаб. Они также ускоряют иммунную реакцию и позволяют снизить дозы антигена приблизительно на два порядка в сравнении с ответами антитела на полную дозу вакцины без CpG, что наблюдалось в некоторых экспериментах (Krieg, 2006). В патенте США № 6 406 705 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 двухцепочечный 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 анти-CD40, имиквимод, резиквимод, ГМ-КСФ, циклофосфамид, сунитиниб, бевацизумаб, интерферон-альфа, CpG олигонуклеотиды и их производные, поли-(I:C) и ее производные, РНК, силденафил и составы из твердых микрочастиц с PLG или виросомы.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Могут быть отобраны аптамеры к сложным мишеням, таким как клетки и ткани и комплексы пептидов, включающих, предпочтительно состоящих из последовательности в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 101, в соответствии с представленным изобретением с молекулой МНС, используя метод cell-SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment - систематическая эволюция лигандов при экспоненциальном обогащении).

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

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

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

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

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

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

Настоящее изобретение относится к пептиду, включающему последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 101 или их вариант, который по меньшей мере на 88% гомологичен (предпочтительно, если он идентичен) последовательности с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 101, или их варианту, который индуцирует перекрестную реакцию Т-клеток с указанным пептидом, где указанный пептид не является базовым полипептидом полной длины.

Настоящее изобретение далее относится к пептиду, включающему последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 101 или их вариант, который по меньшей мере на 88% гомологичен (предпочтительно, если он идентичен) SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 101, где указанный пептид или его вариант имеет общую длину от 8 до 100, предпочтительно от 8 до 30 и, наиболее предпочтительно, от 8 до 14 аминокислот.

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

Настоящее изобретение далее относится к пептидам в соответствии с изобретением, где пептид состоит или состоит по существу из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 101.

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

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

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

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

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

Настоящее изобретение далее относится к пептиду в соответствии с настоящим изобретением, к нуклеиновой кислоте в соответствии с настоящим изобретением или к вектору экспрессии в соответствии с настоящим изобретением для применения в медицине, в частности, в лечении острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, рака пищеводно-желудочного перехода, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легких, карциномы мочевого пузыря, рака эндометрия матки.

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

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

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

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

Настоящее изобретение далее относится к способу в соответствии с изобретением, где антигенпрезентирующая клетка включает вектор экспрессии, способный экспрессировать указанный пептид, содержащий последовательность с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 101 или указанную вариантную аминокислотную последовательность.

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

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

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

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

Настоящее изобретение далее относится к применению в соответствии с изобретением, где указанные раковые клетки являются клетками острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, рака пищеводно-желудочного перехода, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легких, карциномы мочевого пузыря и рака эндометрия матки или клетками других солидных или гематологических опухолей, таких как клетки острого миелоидного лейкоза, рака

молочной железы, холангиоциточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, рака пищеводно-желудочного перехода, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легких, карциномы мочевого пузыря и рака эндометрия матки.

Настоящее изобретение далее относится к конкретным белкам-маркерам и биомаркерам на основе пептидов в соответствии с настоящим изобретением, в контексте изобретения называемые «мишенями», которые могут быть использованы при постановке диагноза и/или составлении прогноза течения острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоциточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, рака пищеводно-желудочного перехода, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легких, карциномы мочевого пузыря и рака эндометрия матки. Настоящее изобретение относится также к применению этих новых мишеней для лечения рака.

Понятие «антитело» или «антитела» используется в контексте данного изобретения в широком смысле и включает как поликлональные, так и моноклональные антитела. В дополнение к интактным или «полным» молекулам иммуноглобулина в понятие «антитела» включены также фрагменты (например, участки CDR, фрагменты Fv, Fab и Fc) или полимеры таких молекул иммуноглобулина и гуманизированные версии молекул иммуноглобулина, при условии, что они проявляют любое из желаемых свойств (например, специфически связываются с (поли)пептидным маркером острого миелоидного лейкоза, рака

молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, рака пищеводно-желудочного перехода, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легких, карциномы мочевого пузыря и рака эндометрия матки, доставляют токсин к клетке острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, рака пищеводно-желудочного перехода, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легких, карциномы мочевого пузыря и рака эндометрия матки, экспрессирующей раковый ген-маркер на повышенном уровне и/или ингибируют активность полипептида-маркера острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, рака пищеводно-желудочного перехода, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легких, карциномы мочевого пузыря и рака эндометрия матки) в соответствии с настоящим изобретением.

Если возможно, антитела по изобретению могут быть куплены в коммерческих источниках. Антитела по изобретению могут быть также получены при использовании хорошо известных способов. Опытному специалисту будет понятно, что для получения антител по изобретению могут использоваться как полипептидные маркеры острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы,

холангиоцеллюлярной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, рака пищевода-желудочного перехода, гепатоцеллюлярной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легких, карциномы мочевого пузыря и рака эндометрия матки полной длины, так и их фрагменты. Полипептид, необходимый для получения антитела по изобретению, может быть частично или полностью очищенным из природного источника или же может быть получен с использованием методики рекомбинантной ДНК.

Например, кДНК, кодирующая пептид в соответствии с настоящим изобретением, такой как пептид с последовательностью с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID No. 101, полипептид или вариант или его фрагмент может быть экспрессирована в прокариотических клетках (например, бактерий) или эукариотических клетках (например, клетках дрожжей, насекомых или млекопитающих), после чего рекомбинантный белок может быть очищен и использован в получении препарата моноклональных или поликлональных антител, которые специфически связываются с полипептидным маркером острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцеллюлярной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, рака пищевода-желудочного перехода, гепатоцеллюлярной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легких, карциномы мочевого пузыря и рака эндометрия матки, использованным для получения антитела по изобретению.

Специалисту данной области будет понятно, что получение двух или более различных наборов моноклональных или поликлональных антител увеличивает

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

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

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

Моноклональные антитела могут быть также получены с помощью технологий рекомбинантных ДНК, таких как описываемые в патенте США № 4 816 567. ДНК, кодирующая моноклональные антитела по изобретению, может быть легко выделена и секвенирована с помощью стандартных методик (например, при использовании олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи мышиных антител).

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

Фрагменты антител, как связанные с другими последовательностями, так и не связанные, могут также включать вставки, делеции, замещения или другие выбранные модификации конкретных участков или аминокислотных остатков при условии, что активность фрагмента незначительно изменена или повреждена по

сравнению с немодифицированным антителом или фрагментом антитела. Данные модификации могут внести некоторые дополнительные свойства, такие как добавление/удаление аминокислот, способных к дисульфидному связыванию, увеличение их биологической стойкости, изменение их секреторных характеристик и т. д. В любом случае, фрагмент антитела должен обладать свойством биологической активности, таким как активностью связывания, регуляцией связывания на связывающем домене и т. д. Функциональные или активные участки антитела могут быть идентифицированы при мутагенезе конкретного участка белка с последующей экспрессией и исследованием экспрессированного полипептида. Такие способы полностью очевидны для опытного специалиста данной области и могут включать сайт-специфический мутагенез нуклеиновой кислоты, кодирующей фрагмент антитела.

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

нечеловеческого иммуноглобулина, и все или по сути все из участков FR являются таковыми консенсусной последовательности иммуноглобулина человека. Оптимально, чтобы гуманизированное антитело содержало также по меньшей мере часть константного участка иммуноглобулина (Fc), как правило, человеческого иммуноглобулина.

Способы гуманизации нечеловеческих антител хорошо известны из уровня техники. В целом, гуманизированное антитело имеет один или более аминокислотный остаток, введенный в него из источника, не являющегося человеческим. Такие аминокислотные остатки нечеловеческого происхождения часто называются «импортированными» остатками, которые обычно берутся из «импортированного» переменного домена. Гуманизация может быть по существу произведена посредством замены участков CDR или последовательностей CDR грызунов на соответствующие последовательности человеческого антитела. Соответственно, такие «гуманизированные» антитела являются химерными антителами (патент США № 4 816 567), где существенно меньшая часть, чем один интактный человеческий переменный домен была заменена соответствующей последовательностью видов, не являющихся человеком. На практике гуманизированные антитела являются обычно человеческими антителами, в которых некоторые остатки CDR и, возможно, остатки FR заменены на остатки аналогичных сайтов антител грызунов.

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

антигенной стимуляции. Человеческие антитела могут быть также получены в библиотеках фагового отображения.

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

Антитела могут вводиться субъекту, пациенту или в клетку посредством инъекции (например, внутривенно, внутривенно, подкожно, внутримышечно) или другими способами, такими как вливание, которое гарантирует доставку к кровотоку эффективным образом. Антитела также могут вводиться 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 суточная доза

антител при монотерапии антителами может варьироваться от около 1 мкг/кг вплоть до 100 мг/кг массы тела или более в день, в зависимости от факторов, упоминаемых выше. После введения антитела, предпочтительно для лечения острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, рака пищеводно-желудочного перехода, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легких, карциномы мочевого пузыря и рака эндометрия матки, эффективность терапевтического антитела может быть оценена различными способами, известными компетентному специалисту данной области. Например, размер, количество и/или распределение рака у субъекта, проходящего лечение, может контролироваться с помощью стандартных методов визуализации опухоли. Введенное в терапевтических целях антитело, которое блокирует рост опухоли, приводит к уменьшению размера и/или предотвращает развитие новых опухолей в сравнении с течением болезни, которое бы имело место без введения антитела, и является эффективным антителом для лечения рака.

В другом аспекте изобретения предложен способ получения растворимого Т-клеточного рецептора (ТКР), распознающего конкретный комплекс пептида и МНС. Такие растворимые Т-клеточные рецепторы могут быть получены из специфических Т-клеточных клонов, и их аффинность может быть повышена за счет мутагенеза, направленного на определяющие комплементарность участки. Для выбора Т-клеточного рецептора может использоваться фаговое отображение (заявка США 2010/0113300, (Liddy et al., 2012)). В целях стабилизации Т-клеточных рецепторов в процессе фагового отображения и в случае практического применения в качестве лекарственного средства альфа- и бета-цепи могут быть связаны, например, посредством не встречающихся в природе дисульфидных связей, других ковалентных связей (одноцепочечный Т-клеточный рецептор) или с

помощью доменов димеризации (Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999). В целях выполнения определенных функций на клетках-мишенях Т-клеточный рецептор может быть связан с токсинами, лекарственными средствами, цитокинами (см., например, заявку США 2013/0115191) и доменами, рекрутирующими эффекторные клетки, такими как анти-CD3 домен, и т. д. Более того, он может быть экспрессирован на Т-клетках, используемых для адоптивного переноса. Дополнительную информацию можно найти в патентных заявках WO 2004/033685A1 и WO 2004/074322A1. Комбинация растворимых ТКР описывается в патентной заявке WO 2012/056407A1. Другие способы получения описаны в патентной заявке WO 2013/057586A1.

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

Эти антитела или ТКР могут также применяться для диагностики *in vivo*. Как правило, антитело помечают радионуклеотидом (таким как ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^3H , ^{32}P или ^{35}S), так что опухоль может быть локализована с помощью иммуноскинтиграфии. В одном варианте осуществления антитела или их фрагменты связываются с внеклеточными доменами двух или более мишеней белка, выбранного из группы, состоящей из указанных выше белков, при показателе аффинности (Kd) ниже чем 1×10 мкМ.

Антитела для диагностических целей могут помечаться зондами, подходящими для обнаружения различными способами визуализации. Способы обнаружения зондов включают, но без ограничения, флуоресценцию, световую, конфокальную и электронную микроскопию; магнитно-резонансную томографию и спектроскопию; флюороскопию, компьютерную томографию и позитронно-эмиссионную томографию. Подходящие зонды включают, но без ограничения, флуоресцеин, родамин, эозин и другие флюорофоры, радиоизотопы, золото, гадолиний и другие

лантаноиды, парамагнитное железо, фтор-18 и другие позитронно-активные радионуклиды. Более того, зонды могут быть би- или мультифункциональными и обнаруживаться более чем одним из приведенных способов. Данные антитела могут быть помечены напрямую или опосредованно указанными зондами. Присоединение зондов к антителам включает ковалентное присоединение зонда, внедрение зонда в антитело и ковалентное присоединение хелатирующего соединения для присоединения зонда, среди других широко признанных методов в данной области. Для иммуногистохимических исследований образец пораженной ткани может быть свежим или замороженным или может быть залит парафином и зафиксирован таким консервантом как формалин. Зафиксированный или залитый срез приводят в контакт с помеченным первичным антителом и вторичным антителом, где антитело используется для обнаружения экспрессии белков *in situ*.

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

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

Линия человеческих клеток с недостаточностью T2, на которые загружаются пептиды, имеется в наличии в Американской коллекции типовых культур, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, США под каталожным номером CRL 1992;

клеточная линия дрозофилы, линия Schneider 2 имеется в наличии в ATCC под каталожным номером CRL 19863; клеточная линия мыши RMA-S описывается в работе Ljunggren и соавт. (Ljunggren and Karre, 1985).

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

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

Если антигенпрезентирующая клетка трансфицирована для экспрессии такого эпитопа, то предпочтительно, чтобы клетка включала вектор экспрессии, способный экспрессировать пептид, содержащий SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 101 или вариант такой аминокислотной последовательности.

Для получения Т-клеток *in vitro* могут быть использованы многие другие способы. Например, для получения ЦТЛ используются аутологичные опухоль-инфильтрующие лимфоциты. Plebanski и соавт. (Plebanski et al., 1995) для получения Т-клеток использовали аутологичные лимфоциты периферической крови (ЛПК). Кроме того, возможно получение аутологичных Т-клеток посредством нагрузки дендритных клеток пептидом или полипептидом или посредством инфицирования рекомбинантным вирусом. Для получения аутологичных Т-клеток также можно использовать В-клетки. Кроме того, для получения аутологичных Т-клеток могут быть использованы макрофаги, нагруженные пептидом или полипептидом или инфицированные рекомбинантным вирусом. S. Walter и соавт. (Walter et al., 2003) описывают прайминг Т-клеток *in vitro* с использованием искусственных антигенпрезентирующих клеток (иАПК), что является также

подходящим способом получения Т-клеток против выбранного пептида. В настоящем изобретении иАПК были получены прикреплением предварительно образованных комплексов МНС-пептид к поверхности полистироловых частиц (микросфер) с помощью биохимического способа с биотином-стрептавидином. Данная система допускает точный контроль плотности МНС на иАПК, который позволяет селективно вызвать высоко- или низкоavidные антигенспецифические Т-клеточные ответы с высокой эффективностью в образцах крови. Кроме комплексов МНС-пептид, иАПК должны нести другие белки с костимуляторной активностью, такие как антитела к CD28, прикрепленные к их поверхности. Кроме того, такая основанная на иАПК система часто требует добавления соответствующих растворимых факторов, к примеру, цитокинов, таких как интерлейкин-12.

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

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

Активированные Т-клетки, полученные с помощью приведенного выше способа, будут селективно распознавать клетку, которая aberrантно экспрессирует

полипептид, включающий аминокислотную последовательность с SEQ ID No. 1 по SEQ ID NO 101.

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

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

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

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

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

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

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

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

В настоящем изобретении также предложен комплект, включающий:

- (а) контейнер, который содержит фармацевтическую композицию, как описанная выше, в виде раствора или в лиофилизированной форме;
- (б) факультативно – второй контейнер, содержащий разбавитель или восстанавливающий раствор для лиофилизированного состава; и
- (в) факультативно – инструкции по (i) применению раствора или (ii) восстановлению 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 (v) шприцев. Контейнер является, предпочтительно, бутылью, флаконом, шприцем или пробиркой; и он может быть контейнером многоразового применения. Фармацевтическая композиция предпочтительно является лиофилизированной.

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

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

контейнер, включающий подходящий разбавитель (например, раствор бикарбоната натрия).

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

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

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

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

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

Так как пептиды по изобретению были выделены из клеток острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, рака пищеводно-желудочного перехода, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легких, карциномы мочевого пузыря и рака эндометрия матки, медикамент по изобретению предпочтительно используется для лечения острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, рака пищеводно-желудочного перехода, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы,

немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легких, карциномы мочевого пузыря и рака эндометрия матки.

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

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

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

из опухолеассоциированных пептидов, которые в высокой степени избыточно экспрессировались в опухолевой ткани пациентов с различными HLA-A, HLA-B и HLA-C-аллелями, больных острым миелоидным лейкозом, раком молочной железы, холангиоцелочной карциномой, хроническим лимфоцитарным лейкозом, колоректальным раком, раком желчного пузыря, глиобластомой, раком желудка, раком пищеводно-желудочного перехода, гепатоклеточной карциномой, плоскоклеточной карциномой головы и шеи, меланомой, неходжкинской лимфомой, немелкоклеточным раком легких, раком яичника, раком пищевода, раком поджелудочной железы, раком предстательной железы, почечно-клеточной карциномой, мелкоклеточным раком легких, карциномой мочевого пузыря и раком эндометрия матки. Оно может содержать пептиды, связанные с молекулами MHC I класса и MHC II класса или удлиненные пептиды, связанные с молекулами MHC I класса. Помимо опухолеассоциированных пептидов, собранных из нескольких тканей острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, рака пищеводно-желудочного перехода, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легких, карциномы мочевого пузыря и рака эндометрия матки, хранилище может содержать маркерные пептиды HLA-A*02, HLA-A*01, HLA-A*03, HLA-A*24, HLA-B*07, HLA-B*08 и HLA-B*44. Эти пептиды позволяют произвести количественное сравнение интенсивности Т-клеточного иммунного ответа, индуцированного пептидами TUMAP, и, следовательно, позволяют сделать важный вывод о способности вакцины вызывать противоопухолевые ответы. Во-вторых, они выполняют функцию важных пептидов положительного контроля, полученных «не из собственного» антигена в случае, если у пациента не наблюдаются вызванные вакциной Т-клеточные ответы на пептиды TUMAP, полученные из «собственных» антигенов. И в-третьих, оно может позволить сделать заключения относительно статуса иммунокомпетентности пациента.

Пептиды TUMAP для хранилища были идентифицированы с помощью интегрированного подхода функциональной геномики, комбинирующего анализ экспрессии генов, масс-спектрометрию и Т-клеточную иммунологию (XPresident®). Этот подход гарантирует, что только те пептиды TUMAP, которые действительно присутствуют в большом проценте опухолей, но не экспрессируются или экспрессируются лишь минимально на нормальной ткани, были выбраны для последующего анализа. В целях первоначального отбора пептидов образцы ткани острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, рака пищеводно-желудочного перехода, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легких, карциномы мочевого пузыря и рака эндометрия матки 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 (острый миелоидный лейкоз, рак молочной железы, холангиоцелочная карцинома, хронический лимфоцитарный лейкоз, колоректальный рак, рак желчного пузыря, глиобластома, рак желудка, рак пищеводно-желудочного перехода, гепатоклеточная карцинома, плоскоклеточная карцинома головы и шеи, меланома, неходжкинская лимфома, немелкоклеточный рак легких, рак яичника, рак пищевода, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечно-клеточная карцинома, мелкоклеточный рак легких, карцинома мочевого пузыря и рак эндометрия матки) по сравнению с рядом нормальных органов и тканей применяли анализ экспрессии информационной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) по всему геному.

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

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

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

6. В целях оценки того, может ли быть осуществима индукция *in vivo* Т-клеточных ответов выбранными пептидами, были проведены анализы иммуногенности *in vitro* при использовании человеческих Т-клеток здоровых доноров, а также пациентов, больных острым миелоидным лейкозом, раком молочной железы, холангиоцелочной карциномой, хроническим лимфоцитарным лейкозом, колоректальным раком, раком желчного пузыря, глиобластомой, раком желудка, раком пищеводно-желудочного перехода, гепатоклеточной карциномой, плоскоклеточной карциномой головы и шеи, меланомой, неходжкинской лимфомой, немелкоклеточным раком легких, раком яичника, раком пищевода, раком поджелудочной железы, раком предстательной железы, почечно-клеточной карциномой, мелкоклеточным раком легких, карциномой мочевого пузыря и раком эндометрия матки.

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

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

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

Фенотип HLA, данные транскриптомики и протеомики собирают с опухолевого материала и образцов крови пациентов для идентификации наиболее подходящих пептидов для каждого пациента, в состав которых входят пептиды TUMAP как из хранилища, так и уникальные для пациента (т. е. мутированные). Выбирать будут те пептиды, которые селективно или избыточно экспрессируются в опухоли пациента 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 абберрантно экспрессируемых опухолью. Предпочтительно, если последовательности лигандов МНС идентифицируются с помощью элюирования связанных пептидов из молекул МНС, выделенных из опухолевого образца, и секвенирования элюированных лигандов. Предпочтительно, если опухолевый образец и нормальная ткань получены от одного и того же пациента.

Помимо этого, или в качестве альтернативы этому, при выборе пептидов с использованием модели хранилища (банка данных) пептиды TUMAP могут быть идентифицированы у пациента *de novo* и затем быть включены в вакцину. В качестве одного примера: пептиды-кандидаты TUMAP могут быть идентифицированы у пациента с помощью (a1) сравнения данных по экспрессии в опухолевом образце с данными нормальной ткани, соответствующей типу ткани опухолевого образца, для идентификации белков, которые в опухолевом образце экспрессируются в избытке или абберрантно; и (a2) установления корреляции между данными экспрессии и последовательностями лигандов МНС, связанных с молекулами МНС I и/или II класса в опухолевом образце, в целях идентификации лигандов МНС, которые получены из белков, избыточно или абберрантно экспрессируемых опухолью. В качестве другого примера: могут быть идентифицированы белки, имеющие мутации, являющиеся уникальными для опухолевого образца, соотносимого с соответствующей нормальной тканью отдельного пациента, и могут быть идентифицированы пептиды TUMAP, специфической мишенью которых является мутация. Например, геном опухоли и соответствующей нормальной ткани могут быть секвенированы методом

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

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

факультативно, выбора по меньшей мере одного пептида, идентифицированного *de novo* на этапе (а) с подтверждением его иммуногенности.

В отдельном варианте осуществления изобретения пептиды, включенные в вакцину, идентифицируют с помощью: (а) идентификации опухолеассоциированных пептидов (TUMAP), 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 отобраны пептиды для персонализированной вакцины на основе пептидов, изготавливают вакцину. Вакцина – это предпочтительно жидкая лекарственная форма, состоящая из отдельных пептидов, растворенных в ДМСО в концентрации 20-40%, предпочтительно около 30-35%, такой как около 33% ДМСО.

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

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

Кроме того, пептиды по настоящему изобретению пригодны не только для лечения рака, но и также в качестве диагностических средств. Так как пептиды были

получены из клеток острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, рака пищеводно-желудочного перехода, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легких, карциномы мочевого пузыря и рака эндометрия матки, и так как было определено, что данные пептиды не присутствуют или присутствуют в небольшом количестве в нормальных тканях, то эти пептиды могут быть использованы для диагностики наличия рака.

Присутствие заявленных пептидов на тканевых биоптатах и в образцах крови может помочь патоморфологу в постановке диагноза рака. Выявление конкретных пептидов с помощью антител, масс-спектрометрии или других методов, известных из уровня техники, могут дать патоморфологу свидетельства того, что образец ткани является злокачественной или воспаленной или пораженной заболеванием вообще, или же может использоваться в качестве биомаркера острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, рака пищеводно-желудочного перехода, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легких, карциномы мочевого пузыря и рака эндометрия матки. Присутствие групп пептидов может позволить классифицировать или выделить подклассы пораженных тканей.

Обнаружение пептидов на образцах пораженной заболеванием ткани может позволить принять решение о пользе от терапии, воздействующей на иммунную систему, в особенности, если Т-лимфоциты, как известно или ожидается,

задействованы в механизме действия. Отсутствие экспрессии МНС является хорошо описанным механизмом, при котором инфицированные или злокачественные клетки уклоняются от иммунного контроля. Таким образом, присутствие пептидов показывает, что этот механизм не используется проанализированными клетками.

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

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

ФИГУРЫ

На Фигурах 1А–F представлена избыточная презентация различных пептидов в различных раковых тканях (черные точки). Верхняя часть: Медианные показатели

интенсивности MS-сигналов технических репликатов нанесены в виде точек для единичных HLA-A*02-положительных образцов нормальной ткани (серые точки, левая часть изображения) и опухолевых образцов (черные точки, правая часть изображения), на которых был обнаружен пептид. Прямоугольниками («ящиками») обозначены медианное значение, 25-ый и 75-ый процентиля нормализованного уровня интенсивности сигнала, тогда как «усы» распространяются до самой низкой точки данных, всё еще в пределах 1,5 межквартильного диапазона (IQR) нижнего квартиля и до наивысшей точки данных, всё еще в пределах 1,5 IQR верхнего квартиля. Нормальные органы расположены в соответствии с категориями риска (клетки крови, кровеносные сосуды, головной мозг, печень, легкие: высокий уровень риска, серые точки; органы репродуктивной системы, молочная железа, предстательная железа: низкий уровень риска, серые точки; все остальные органы: средний уровень риска; серые точки). Нижняя часть: Относительная частота обнаружения пептида в каждом органе представлена в виде столбчатой диаграммы. Цифры под графиком обозначают число образцов, на которых был обнаружен пептид из общего числа проанализированных образцов для каждого органа (N = 440 для образцов нормальных тканей, N = 490 для образцов опухолевых тканей). Если пептид был обнаружен на образце, но по техническим причинам не могло быть проведено количественное определение, образец включали в данный график репрезентации частоты обнаружения, но в верхней части фигуры точку не обозначали. Ткани (слева направо): Нормальные образцы: клетки крови; кров. сосуды (кровеносные сосуды); головн. мозг (головной мозг); сердце; печень; легкое; моноциты; Т-клетки; жир. ткань (жировая ткань); надпочечн. ж. (надпочечная железа); желчн. проток (желчный проток); мочев. п. (мочевой пузырь); КМ (костный мозг); пищевод; глаз; желчн. пуз. (желчный пузырь); голова и шея; толст. киш. (толстая кишка); тонк. киш. (тонкая кишка); почка; ЛУ (лимфатический узел); центр. нерв (центральный нерв); периф. нерв (периферический нерв); подж. жел. (поджелудочная железа); парацит. (парацитаровидная железа); брюшина; гипофиз; плевра; скел. мышца (скелетная мышца); кожа; спинной мозг; селезенка; желудок; щитов. жел. (щитовидная железа); трахея; мочеточн. (мочеточник); молочн. жел. (молочная железа); яичник; плацента; предст. жел. (предстательная железа);

семенник; вилочк. жел. (вилочковая железа); матка. Опухолевые образцы: ОМЛ (острый миелоидный лейкоз); РМЖ (рак молочной железы); ХГК (холангиоцеллюлярная карцинома); ХЛЛ (хронический лимфоцитарный лейкоз); КРК (колоректальный рак); РЖП (рак желчного пузыря); ГБМ (глиобластома); РЖ (рак желудка); РПЖП: рак пищеводно-желудочного перехода; ГКК (гепатоцеллюлярная карцинома); ПлККГШ (плоскоклеточная карцинома головы и шеи); МЕЛ (меланома); НХЛ (неходжкинская лимфома); НМРЛадено (немелкоклеточный рак легких - аденокарцинома); НМРЛдругие (образцы НМРЛ, которые не могут быть однозначно отнесены к НМРЛадено и НМРЛплоск); НМРЛплоск (плоскоклеточный немелкоклеточный рак легких); РЯ (рак яичника); РП (рак пищевода); РПЖ (рак поджелудочной железы); РПрЖ (рак предстательной железы); ПКК (почечноклеточная карцинома); МРЛ (мелкоклеточный рак легких); КМП (карцинома мочевого пузыря); РЭМ (рак эндометрия матки). Фигура 1А) пептид: KLLDFSTRI (SEQ ID NO.: 1), Фигура 1В) пептид: ALLDVLVKL (SEQ ID NO.: 2), Фигура 1С) пептид: FLLVPSPIWQL (SEQ ID NO.: 3), Фигура 1D) пептид: LVWEVVESV (SEQ ID NO.: 5), Фигура 1E) пептид: SLLDKLSGI (SEQ ID NO.: 10). На Фигуре 1F представлена избыточная презентация различных пептидов в различных раковых тканях (черные точки). Верхняя часть: Медианные показатели интенсивности МС-сигналов технических репликатов нанесены в виде точек для единичных HLA-A*03-положительных образцов нормальной ткани (серые точки, левая часть изображения) и опухолевых образцов (черные точки, правая часть изображения), на которых был обнаружен пептид. Прямоугольниками («ящиками») обозначены медианное значение, 25-ый и 75-ый процентиля нормализованного уровня интенсивности сигнала, тогда как «усы» распространяются до самой низкой точки данных, всё еще в пределах 1,5 межквартильного диапазона (IQR) нижнего квартиля и до наивысшей точки данных, всё еще в пределах 1,5 IQR верхнего квартиля. Нормальные органы расположены в соответствии с категориями риска (клетки крови, кровеносные сосуды, головной мозг, печень, легкие: высокий уровень риска, серые точки; органы репродуктивной системы, молочная железа, предстательная железа: низкий уровень риска, серые точки; все остальные органы: средний уровень риска; серые точки). Нижняя часть: Относительная частота

обнаружения пептида в каждом органе представлена в виде столбчатой диаграммы. Цифры под графиком обозначают число образцов, на которых был обнаружен пептид из общего числа проанализированных образцов для каждого органа (N = 36 для образцов нормальных тканей, N = 107 для образцов опухолевых тканей). Если пептид был обнаружен на образце, но по техническим причинам не могло быть проведено количественное определение, образец включали в данный график репрезентации частоты обнаружения, но в верхней части фигуры точку не обозначали. Ткани (слева направо): Нормальные образцы: клетки крови; кров. сосуды (кровеносные сосуды); головной мозг; сердце; печень; легкое; надпочечник; мочев. п. (мочевой пузырь); желчн. п. (желчный пузырь); тонк. киш. (тонкая кишка); ЛУ (лимфатический узел); подж. жел. (поджелудочная железа); кожа; селезенка; трахея. Опухолевые образцы: ОМЛ (острый миелоидный лейкоз); РМЖ (рак молочной железы); ХГК (холангиоцеллюлярная карцинома); ХЛЛ (хронический лимфоцитарный лейкоз); КРК (колоректальный рак); РЖП (рак желчного пузыря); ГБМ (глиобластома); РЖ (рак желудка); ГКК (гепатоцеллюлярная карцинома); ПлККГШ (плоскоклеточная карцинома головы и шеи); МЕЛ (меланома); НХЛ (неходжкинская лимфома); НМРЛадено (немелкоклеточный рак легких - аденокарцинома); НМРЛдругие (образцы НМРЛ, которые не могут быть однозначно отнесены к НМРЛадено и НМРЛплоск); НМРЛплоск (плоскоклеточный немелкоклеточный рак легких); РЯ (рак яичника); РП (рак пищевода); РПЖ (рак поджелудочной железы); РПрЖ (рак предстательной железы); ПКК (почечноклеточная карцинома); МРЛ (мелкоклеточный рак легких); КМП (карцинома мочевого пузыря); РЭМ (рак эндометрия матки). Фигура 1F) пептид: SLLGAATVEPPK (SEQ ID NO.: 81; A*03).

На Фигурах 2A – 2F представлены примеры профилей экспрессии исходных генов настоящего изобретения, которые экспрессированы в избытке в различных раковых образцах. Опухолевые (черные точки) и нормальные (серые точки) образцы сгруппированы по органам происхождения. на диаграммах размаха («ящик с усами») представлены медиана, 25-ый и 75-ый процентиля (ящик) значений RPKM плюс усы, которые распространяются до самой низкой точки данных, всё еще в пределах 1,5 межквартильного диапазона (IQR) нижнего квартиля и до наивысшей

точки данных, всё еще в пределах 1,5 IQR верхнего квартиля. Нормальные органы расположены в соответствии с категориями риска. FPKM = фрагментов на тысячу пар оснований на миллион картированных ридов. Ткани (слева направо): Нормальные образцы: клетки крови; кровен. сосуды (кровеносные сосуды); головной мозг; сердце; печень; легкое; жировая ткань; надпочечник; желчн. прот. (желчные протоки); мочев. п. (мочевой пузырь); КМ (костный мозг); пищевод; глаз; желчн. пуз. (желчный пузырь); голова и шея; толст. киш. (толстая кишка); тонк. киш. (тонкая кишка); почка; ЛУ (лимфатический узел); периф. нерв (периферический нерв); подж. железа (поджелудочная железа); парацит. (парацитарная железа); брюшина; гипофиз; плевра; скел. мышца (скелетная мышца); кожа; селезенка; желудок; щитов. жел. (щитовидная железа); трахея; мочеточник; молочн. жел. (молочная железа); яичник; плацента; предст. жел. (предстательная железа); семенник; вилочк. жел. (вилочковая железа); матка. Опухолевые образцы: ОМЛ (острый миелоидный лейкоз); РМЖ (рак молочной железы); ХГК (холангиоцеллюлярная карцинома); ХЛЛ (хронический лимфоцитарный лейкоз); КРК (колоректальный рак); РЖП (рак желчного пузыря); ГБМ (глиобластома); РЖ (рак желудка); ГКК (гепатоцеллюлярная карцинома); ПлККГШ (плоскоклеточная карцинома головы и шеи); МЕЛ (меланома); НХЛ (неходжкинская лимфома); НМРЛадено (немелкоклеточный рак легких - аденокарцинома); НМРЛдругие (образцы НМРЛ, которые не могут быть однозначно отнесены к НМРЛадено и НМРЛплоск); НМРЛплоск (плоскоклеточный немелкоклеточный рак легких); РЯ (рак яичника); РП (рак пищевода); РПЖ (рак поджелудочной железы); РПрЖ (рак предстательной железы); ПКК (почечноклеточная карцинома); МРЛ (мелкоклеточный рак легких); КМП (карцинома мочевого пузыря); РЭМ (рак эндометрия матки). Фигура 2A) идент. № Ensembl: ENST00000225964, пептид: ALLDVLVKL (SEQ ID No.: 2), Фигура 2B) идент. № Ensembl: ENST00000374472, пептид: SLLDKLSGI (SEQ ID No 10), Фигура 2C) идент. № Ensembl: ENST00000617924, пептид: FASERPPSV (SEQ ID No.: 33), Фигура 2D) идент. № Ensembl: ENST00000603198, пептид: YIYEDEVRL (SEQ ID No.: 39), Фигура 2E) идент. № Ensembl: ENST00000420453, пептид: AIWSTILIA (SEQ ID No.: 43), Фигура 2F) идент. № Ensembl: ENST00000473984, пептид: IAISQLTFV (SEQ

ID No.: 65), Фигура 2G) идент. № Ensembl: ENST00000375105.7, пептид: LLLALRLSL (SEQ ID No.: 64).

На Фигуре 3 представлены типичные результаты пептид-специфических ответов *in vitro* CD8+ Т-клеток здорового HLA-A*02+ донора. CD8+ Т-клетки примировали с помощью искусственных АПК, стимулированных моноклональными антителами к CD28 и HLA-A*02 в комплексе с пептидом с последовательностью SEQ ID No. 102 (GLDPTQFRV, код пептида: POLA1-003) (А, левая секция) и с пептидом с последовательностью SEQ ID No. 103 (SLVSYLDKV, код пептида: KRT16P-001) (В, левая секция). После трех циклов стимуляции обнаружение клеток, реагирующих с пептидом, производилось с помощью двойного окрашивания мультимерами A*02/SeqID No 102 (А) и A*02/SeqID No 103 (В). Правая секция (А и В) представляет собой контрольное окрашивание клеток, простимулированных нерелевантными комплексами пептида и A*02. Из числа отдельных жизнеспособных клеток путем гейтирования выделяли CD8+ лимфоциты. Гейты Буля помогали исключить ложноположительные ответы, обнаруженные с помощью мультимеров, специфических в отношении различных пептидов. Указывается частота выявления специфических мультимер-положительных клеток среди CD8+ лимфоцитов.

На Фигуре 4 представлены типичные результаты пептид-специфических ответов *in vitro* CD8+ Т-клеток здорового HLA-A*02+ донора. CD8+ Т-клетки примировали с помощью искусственных АПК, стимулированных моноклональными антителами к CD28 и HLA-A*02 в комплексе с пептидом с последовательностью SeqID No 18 (KMMTFFQGL) (А, левая секция), пептидом SeqID No 68 (KLLADAFKV) (В, левая секция), пептидом SeqID No 40 (FTLPFLVNL) (С, левая секция), пептидом SeqID No 19 (MLLPWLPKL) (D, левая секция) или пептидом SeqID No 48 (MLAEIHPKA) (Е, левая секция), соответственно. После трех циклов стимуляции обнаружение клеток, реагирующих с пептидом, производилось с помощью двойного окрашивания мультимерами, используя A*02/SeqID No 18 (А), A*02/SeqID No 68 (В), A*02/SeqID No 40 (С), A*02/SeqID No 19 (D) или A*02/SeqID No 48 (Е). Правые секции (А, В, С, D и Е) представляют собой контрольное окрашивание клеток, простимулированных

нерелевантными комплексами пептида и A*02. Из числа отдельных жизнеспособных клеток путем гейтирования выделяли CD8+ лимфоциты. Гейты Буля помогали исключить ложно-положительные ответы, обнаруженные с помощью мультимеров, специфических в отношении различных пептидов. Указывается частота выявления специфических мультимер-положительных клеток среди CD8+ лимфоцитов.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1:

Идентификация и количественное определение опухолеассоциированных пептидов, презентруемых на поверхности клетки

Образцы тканей

Опухолевые ткани пациентов были получены из: Asterand (Детройт, Мичиган, США и Ройстон, Хартфордшир, Великобритания); Bio-Options Inc. (Бри, Калифорния, США); Geneticist Inc. (Глендейл, Калифорния, США); Университетской клиники г. Гейдельберг (Гейдельберг, Германия); ProteoGenex Inc. (Кальвер-Сити, Калифорния, США); Tissue Solutions Ltd (Глазго, Великобритания); Университетской клиники г. Мюнхен (Мюнхен, Германия). Нормальные ткани были получены из компаний Asterand (Детройт, Мичиган, США и Ройстон, Хартфордшир, Великобритания); Bio-Options Inc. (Бри, Калифорния, США); BioServe (Белтсвилль, Мэриленд, США); Capital BioScience Inc. (Роквилл, Мэриленд, США); Центра клинической трансфузиологии г. Тюбингена (Тюбинген, Германия); Geneticist Inc. (Глендейл, Калифорния, США); Медицинского университета префектуры Киото (КРUM) (Киото, Япония); Осацкого городского университета (OCU) (Осака, Япония); ProteoGenex Inc. (Кальвер-Сити, Калифорния, США), Tissue Solutions Ltd (Глазго, Великобритания), Университетской клиники г. Женева (Женева, Швейцария), Университетской клиники г. Гейдельберг (Гейдельберг, Германия), Университетской клиники г. Тюбинген (Тюбинген, Германия); Университетской клиники г. Мюнхен (Мюнхен, Германия).

Перед проведением хирургической операции или аутопсии было получено информированное согласие всех пациентов в письменной форме. Сразу же после удаления ткани были подвергнуты шоковой заморозке и хранились до выделения TUMAP-пептидов при температуре -70°C или ниже.

Выделение пептидов HLA из образцов тканей

Пулы пептидов HLA из подвергнутых шоковой заморозке образцов тканей были получены методом иммунопреципитации из плотных тканей в соответствии с незначительно измененным протоколом (Falk et al., 1991; Seeger et al., 1999) при использовании HLA-A*02-специфического антитела BB7.2, HLA-A, -B, -C-специфического антитела W6/32, HLA-DR-специфического антитела L243 и специфического к HLA-DP антителу B7/21, CNBr-активированной сефарозы, кислотной обработки и ультрафильтрации.

Масс-спектрометрический анализ

Полученные пулы комплексов пептид-HLA были разделены в соответствии с их гидрофобностью обратнофазовой хроматографией (nanoAcquity UPLC system, Waters), и элюированные пептиды анализировали на гибридных масс-спектрометрах LTQ-velos и -fusion (ThermoElectron), снабженном источником ESI. Пулы пептидов наносили непосредственно на аналитическую микрокапиллярную колонку из плавленного кварца (75 мкм в/д x 250 мм) с обращеннофазовым сорбентом 1,7 мкм C18 (Waters) с применением скорости потока в 400 нл в минуту. Затем пептиды разделяли с использованием двухэтапного 180-минутного бинарного градиента от 10% до 33% растворителя B при скорости потока 300 нл в минуту. Для создания градиента использовали растворитель A (0,1% муравьиной кислоты в воде) и растворитель B (0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле). Позолоченный стеклянный капилляр (PicoTip, New Objective) использовали для введения в источник наноESI. Масс-спектрометры LTQ-Orbitrap работали в информационно-зависимом режиме с применением стратегии TOP5. Вкратце, цикл сканирования начинался с полного сканирования с высокой точностью масс на

спектрометре Orbitrap ($R = 30\ 000$), за чем следовало сканирование MS/MS также на Orbitrap ($R = 7500$) на 5 особенно многочисленных ионах-предшественниках с динамическим исключением отобранных ранее ионов. Tandемные масс-спектры были интерпретированы с помощью программ SEQUEST с фиксированным уровнем ложноположительных обнаружений ($q \leq 0,05$) и дополнительным контролем в ручном режиме. В случае, если идентифицированная последовательность пептида была неопределенной, ее дополнительно подтверждали сравнением полученной картины фрагментации природного пептида с картиной фрагментации синтетического контрольного пептида с идентичной последовательностью.

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

миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, рака пищеводно-желудочного перехода, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легких, карциномы мочевого пузыря и рака эндометрия матки с фоновым уровнем образцов нормальной ткани. Профили презентации типичных пептидов, презентуемых в избытке, показаны на Фигуре 1. Презентация типичных пептидов на опухолях показана в Таблице 11.

В Таблице 11 показана презентация выбранных пептидов при различных раковых заболеваниях и, таким образом, конкретная значимость упомянутых пептидов для диагностики и/или лечения указанных раковых заболеваний (например, пептида с последовательностью SEQ ID No. 1 – для острого миелоидного лейкоза, колоректального рака, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака пищевода, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легких, карциномы мочевого пузыря, рака эндометрия и матки, пептида с последовательностью SEQ ID No. 2 – для рака молочной железы, колоректального рака, рака желчного пузыря, рака пищеводно-желудочного перехода, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, мелкоклеточного рака легких, рака эндометрия матки).

Таблица 11: Сводка данных презентации выбранных опухолеассоциированных пептидов по настоящему изобретению среди различных видов.

Вид рака: ОМЛ (острый миелоидный лейкоз); РМЖ (рак молочной железы); ХГК (холангиоцелочная карцинома); ХЛЛ (хронический лимфоцитарный лейкоз); КРК

(колоректальный рак); РЖП (рак желчного пузыря); ГБМ (глиобластома); РЖ (рак желудка); РПЖП (рак пищеводно-желудочного перехода; ГКК (гепатоклеточная карцинома); ПлККГШ (плоскоклеточная карцинома головы и шеи); МЕЛ (меланома); НХЛ (неходжкинская лимфома); НМРЛадено (немелкоклеточный рак легких - аденокарцинома); НМРЛдругие (образцы НМРЛ, которые не могут быть однозначно отнесены к НМРЛадено и НМРЛплоск); НМРЛплоск (плоскоклеточный немелкоклеточный рак легких); РЯ (рак яичника); РП (рак пищевода); РПЖ (рак поджелудочной железы); РПрЖ (рак предстательной железы); ПКК (почечноклеточная карцинома); МРЛ (мелкоклеточный рак легких); КМП (карцинома мочевого пузыря); РЭМ (рак эндометрия матки)

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептида на различных видах рака
1	KLLDFSTRI	ОМЛ, КРК, ГБМ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛ, РЯ, РП, РПрЖ, ПКК, МРЛ, КМП, РЭМ
2	ALLDVLVKL	РМЖ, КРК, РЖП, РПЖП, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛ, РЯ, РП, РПЖ, МРЛ, РЭМ
3	FLLVPSPWQL	ОМЛ, ХЛЛ, КРК, ГБМ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛ, РЯ, ПКК, МРЛ, РЭМ
4	YLGDSHVL	ОМЛ, РМЖ, ХЛЛ, СЕС, ГБМ, ГКК, МЕЛ, НХЛ, НМРЛ, РП, ПКК, МРЛ, КМП
5	LWEEVVEV	ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛ, РЯ, РП
6	ALHDSPVYL	ОМЛ, РМЖ, ХГК, КРК, ГБМ, РЖ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛ, РЯ, РП, ПКК, МРЛ, КМП, РЭМ
7	ALWEEVKA	ГБМ, ГКК, МЕЛ, НМРЛ, РЯ, МРЛ, РЭМ
8	ILQSLVPAA	КРК, НХЛ, НМРЛ, РЯ, ПКК
9	FLQEGDLIS	ХЛЛ, КРК, НХЛ, НМРЛ, РП, МРЛ
10	SLLDKLSGI	ХЛЛ, КРК, НХЛ
11	ALLPHAPE	РМЖ, ГКК, ПлККГШ, НХЛ, НМРЛ, РЯ, РП, МРЛ, КМП
12	HLDSMNVS	ОМЛ, ХЛЛ, РЖ, МЕЛ, НХЛ, РПЖ, РПрЖ
13	FLDEGSLL	РЖ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, РЯ, РПЖ, МРЛ, РМП
14	LLIEVSEEL	РМЖ, КРК, ГБМ, ГКК, РП, МЕЛ, НХЛ, НМРЛ, РПЖ, МРЛ
15	NLVMPLLHI	ОМЛ, ХЛЛ, КРК, МЕЛ, НМРЛ, РЯ, РПЖ, РЭМ
16	ALLDAEQS	ОМЛ, ХЛЛ, ГКК, МЕЛ, НХЛ, НМРЛ, ПКК

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептида на различных видах рака
17	VLWDLRPS SLI	ХЛЛ, ПлККГШ, НХЛ, НМРЛ, РПЖ, МРЛ
18	KMMTFFQ GL	ГКК, НМРЛ, НХЛ, РП, РПрЖ, КМП
19	MLLPWLPK L	ХЛЛ, ГБМ, ГКК, ПлККГШ, НХЛ, НМРЛ
20	VLISLPGKV	ГКК, МЕЛ, НМРЛ
21	FVFISPSFL	ОМЛ, РМЖ, ХГК, КРК, РЖ, ГКК, ПлККГШ, НХЛ, НМРЛ, РЯ, РПЖ, РПрЖ
22	SLYDVPVG A	ХЛЛ, КРК, ГБМ, ГКК, МЕЛ, НХЛ, НМРЛ, РЯ, РП, РПЖ, ПКК, КМП
23	GLEVLDA L	РМЖ, КРК, РЖ, ГКК, МЕЛ, НХЛ, НМРЛ, ПКК, РЭМ
24	TLTSLNILL	ОМЛ, КРК, ГБМ, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛ, РЯ, РП, МРЛ, РЭМ
25	ISVLNLSAI	ХГК, ГКК, МЕЛ, НХЛ, НМРЛ, РЯ, РПрЖ, МРЛ
26	KLWTSLVN L	ОМЛ, ХЛЛ, КРК, РЖ, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛ, РПЖ, МРЛ
27	IAAGVPNT DA	РМЖ, ХЛЛ, ГКК, МЕЛ, НМРЛ, РЯ, ПКК
28	SQLEKPE T A	ГКК, ПлККГШ, НХЛ, НМРЛ, МРЛ, РЭМ
29	LLWEFPSM A	ОМЛ, ХЛЛ, ГБМ, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛ, РЭМ
30	LLRLTLLPL	ХЛЛ, ГКК, НХЛ, НМРЛ, РЯ, РЭМ
31	VVLPIVITL	РЖ, ГКК, НХЛ, НМРЛ, ПКК, РПЖ
32	VLSVSAVL GA	ХЛЛ, ГБМ, РЖ, НМРЛ, РЯ, РП, РПрЖ, ПКК
33	FASERPPS V	РМЖ, КРК, РЖ, РЖП, ГБМ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛ, РЯ, РП, РПЖ, МРЛ, КМП
34	LLNVEPAG A	ОМЛ, РМЖ, ХЛЛ, ГБМ, ГКК, МЕЛ, НХЛ, РЭМ
35	VLLNSNYP V	НМРЛ, РПрЖ, КМП
36	FQVTRTTG V	РЖП, ГКК, НХЛ, НМРЛ, ПКК
37	KILDEFYNV	КРК, РЖ, ГКК, НМРЛ
38	SLSAWLPS L	РЖ, ГКК, ПлККГШ, НМРЛ, РЯ, РП, ПКК, КМП, РЭМ
39	YIYEDEVRL	РМЖ, КРК, ГКК, ПлККГШ, НМРЛ, РЯ, РП, МРЛ, РЭМ
40	FTLPFLVNL	ОМЛ, ХЛЛ, КРК, РЖ, НХЛ, ГКК, ПлККГШ, НМРЛ, РЯ, КМП
41	LMASEGIW ESSL	КРК, РЖ, НМРЛ, РПрЖ

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептида на различных видах рака
42	WITPVI PAL	ОМЛ, ХЛЛ, КРК, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, РЯ, РПЖ, ПКК, МРЛ, КМП, РЭМ
43	AIWSTILIA	РМЖ, КРК, НМРЛ, РЯ, РП, РПрЖ, МРЛ
44	WLIPRQLA AA	РПрЖ
45	ALYHQSP L	ПлККГШ, НМРЛ, РП, РЯ
46	AMVEIIPKV	НМРЛ, МРЛ, КМП
47	ALLPGVPG L	КРК, РЖП, ПлККГШ, НМРЛ, РЯ, ПКК
48	MLAEIHPK A	ОМЛ, РМЖ, ГБМ, МЕЛ, НМРЛ
49	FLWDPRDV VL	ГБМ, РЯ
50	GLASYLDR V	РМЖ, КРК, ГКК, ПКК, РЯ, РП, МРЛ, КМП
51	GLLTQVHIL	ОМЛ, РМЖ, КРК, ГБМ, ГКК, НМРЛ, РПЖ, КМП
52	LAFVSHVLI	КРК, РЖ
53	TISISLSSV	ОМЛ, ХЛЛ, КРК, ГБМ, РЖ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛ, РЯ, РП, РПЖ, РПрЖ, ПКК, МРЛ, КМП, РЭМ
54	GLSPDQVF L	ГБМ, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ
55	MVQQEKLF V	ОМЛ, РМЖ, КРК, ГБМ, РЖ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛ, РП, РПЖ, РПрЖ, ПКК, МРЛ, КМП, РЭМ
56	IITNLIVNI	ОМЛ, КРК, РЖП, ГБМ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛ, РЯ, ПКК, МРЛ, РЭМ
57	YVLM T S L L L	РМЖ, КРК, ГБМ, РЖ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛ, РП, РПрЖ, МРЛ
58	MIISHRALE L	ХЛЛ, КРК, РЖП, ГБМ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛ, РЯ, РПрЖ, КМП
59	LAASTTFL GV	ПлККГШ, НХЛ, НМРЛ, РП, РПЖ, КМП
60	LLLATLENL	ОМЛ, КРК, ГБМ, МЕЛ, НМРЛ, МРЛ, КМП, РЭМ
61	VLPWQPLL L	ОМЛ, РЖ, ГКК, ПлККГШ, НМРЛ, РЯ, РПЖ
62	SLLGKPG L TI	РМЖ, ХЛЛ, КРК, РЖП, ГКК, НХЛ, НМРЛ, РП, ПКК, РПрЖ, КМП, РЭМ
63	LSFKRSLSI	ОМЛ, РМЖ, КРК, ГБМ, ГКК, НМРЛ, РПрЖ, ПКК, КМП
64	LLLALRLSL	РЖП, ГКК, НХЛ, МЕЛ, НМРЛ, РП, РПЖ
65	IAISQLTFV	ХЛЛ, ГКК, НХЛ, НМРЛ, РП, РПрЖ, МРЛ, РЭМ
66	ILNELLNSI	РЖП, РЖ, ГКК, МЕЛ, НХЛ, РПрЖ, МРЛ
67	ALKELMG P A	НХЛ, НМРЛ, ПКК

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептида на различных видах рака
68	KLLADAFK V	ОМЛ, ГКК, ПлККГШ, НМРЛ, ПКК, КМП, РЭМ
69	LLCPVVLQ L	ОМЛ, ХЛЛ, КРК, НМРЛ, ПКК, КМП, РЭМ
70	LLLQIEPAA	ГБМ, ПлККГШ, НХЛ, НМРЛ, КМП
71	WLMPVMP AL	ХЛЛ, ГБМ, РЖ, МЕЛ
72	YLSFIKILL	МЕЛ, РПрЖ
73	STTIINLIL	ОМЛ, РМЖ, КРК, ПлККГШ, ГКК, НМРЛ, РЯ, РПЖ
74	TLLSYSIPL	КРК, РЖ, МЕЛ, РПЖ, РПрЖ, РЭМ
75	TTQEAEL LER	РМЖ, РЖП, РЖ, ГКК, ПлККГШ, НМРЛ, РЯ, РПЖ, РПрЖ, МРЛ, КМП, РЭМ
76	TEQGPTGV TM	ОМЛ, ХЛЛ, КРК, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛ, РП, РЯ, ПКК, РЭМ
77	VPAGVDVI TEY	РПрЖ
78	GLLPPVRA M	РЖП, НХЛ, РП
79	KIQDPGTA F	РПрЖ
80	RDQIVTVS V	ОМЛ, РМЖ, НХЛ, МРЛ, КМП, РЭМ
81	SLLGAATV EPPK	ОМЛ, РМЖ, СС, РЖП, ГБМ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛ, РЯ, РП, РПЖ, РПрЖ, ПКК, МРЛ, КМП, РЭМ
82	LAPQMIAL	ХЛЛ, РЖП, РЖ, ГКК, МЕЛ, НХЛ, НМРЛ, РЯ, РП, РПрЖ, КМП, МРЛ
83	KPRGPTPL	РМЖ, РЖ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛ, РПЖ, ПКК, МРЛ, КМП
84	RLCPAAPS EK	РМЖ, ХГК, КРК, ГБМ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛ, РЯ, РП, РПЖ, ПКК, КМП, РЭМ
85	VYLLTFPPL	РМЖ, РЖ, ГКК, ПлККГШ, НХЛ, НМРЛ, РЯ, РП, КМП, РЭМ
86	LMIGKRIL	ГКК, ПлККГШ, НМРЛ, РЯ, РП, РПЖ, МРЛ, РЭМ
87	LNLVSETE AMVK	КРК, РЭМ
88	DEQETDAF LL	НМРЛ
89	MIFYVLQK	ОМЛ, РМЖ, ХГК, КРК, ГБМ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛ, РЯ, РП, РПЖ, РПрЖ, ПКК, МРЛ, КМП, РЭМ
90	YLRDFKIKR	ОМЛ, РМЖ, ГБМ, РЖ, ГКК, ПлККГШ, НМРЛ, РПрЖ, ПКК, МРЛ, КМП, РЭМ
91	SSHFILVTF	ХГК, РЖ, ГКК, ПКК
92	ELVAVTSV L	ХЛЛ, НХЛ, РПЖ, МРЛ, РЭМ

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептида на различных видах рака
93	WQKNSMR L	НМРЛ
94	MGRRRNL Y	ХГК, ГБМ, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛ, РЯ, РП, РПЖ, РПрЖ, МРЛ, КМП, РЭМ
95	QVKIVTLL	РЖ, НМРЛ, РЯ, РПЖ, РПрЖ, ПКК
96	KIIEDLANT V	ХГК, КРК, ГКК, НМРЛ, РЯ, РП, РПрЖ, МРЛ, КМП, РЭМ
97	GLIDDKGTI KL	ОМЛ, РМЖ, КРК, РЖП, ГБМ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛ, РЯ, РП, МРЛ, КМП, РЭМ
98	SLMEVTHD L	РМЖ, ГБМ, ГКК, ПлККГШ, НХЛ, НМРЛ, РЯ, РП, РПрЖ, КМП, РЭМ
99	ALMDGSES RFFV	РМЖ, ХЛЛ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛ, РЯ, РЭМ
100	SLGPPPVG V	ОМЛ, ГБМ, РЯ, КМП
101	KLPEGHLP EV	ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛ, РП, РПЖ, ПКК

ПРИМЕР 2:

Определение профиля экспрессии генов, кодирующих пептиды по изобретению

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

Источники и приготовление РНК

Хирургически удаленные тканевые препараты были предоставлены различными организациями, которые перечислены выше (см. Пример 1) после получения письменной формы информированного согласия от каждого пациента. Препараты

опухолевой ткани были мгновенно заморожены после операции и впоследствии гомогенизированы с помощью ступки и пестика в жидком азоте. Суммарная РНК была приготовлена из данных образцов с использованием реагента TRI (Ambion, Дармштадт, Германия) с последующей очисткой на RNeasy (QIAGEN, Хильден, Германия); оба метода осуществлялись в соответствии с указаниями производителей.

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

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

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

Эксперименты по секвенированию РНК

Анализ экспрессии гена в образцах РНК опухолевой и нормальной ткани проводили способом секвенирования следующего поколения (RNAseq) лабораторией CeGaT (Тюбинген, Германия). Вкратце, библиотеки секвенирования подготавливали при использовании набора реактивов Illumina HiSeq v4 согласно протоколу производителя (Illumina Inc., Сан-Диего, Калифорния, США), в который входит фрагментация РНК, синтез кДНК и добавление адаптеров секвенирования.

Библиотеки, полученные из многочисленных образцов, смешивали в эквимольном соотношении и секвенировали на системе компании Illumina HiSeq 2500 согласно инструкциям производителя, получая одноконцевые риды длиной 50 пар оснований. Обработанные риды картируют на человеческий геном (GRCh38) с помощью программного обеспечения STAR. Данные по экспрессии представляются на уровне транскриптов в виде RPKM (число ридов на тысячу пар нуклеотидов, отнесенное на миллион картированных ридов с помощью программного обеспечения Cufflinks) и на уровне экзонов (общее число ридов, получаемых с помощью программного обеспечения Bedtools), на основании идентификаций по банку данных последовательностей ensembl (Ensembl77). Для получения значений RPKM риды экзонов нормализованы по длине экзона и размеру выравнивания.

Типичные профили экспрессии исходных генов, предложенных в настоящем изобретении, которые в высокой степени экспрессированы в избытке или исключительно экспрессированы в случае острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, рака пищевода-желудочного перехода, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легких, карциномы мочевого пузыря и рака эндометрия матки, представлены на Фигуре 1. Показатели экспрессии других иллюстративных генов показаны в Таблице 12.

Таблица 12: Показатели экспрессии. В таблице представлены пептиды, полученные из генов, которые в очень высокой степени избыточно экспрессируются в опухолях в сравнении с панелью нормальных тканей (+++), в высокой степени избыточно экспрессируются в опухолях в сравнении с панелью нормальных тканей (++) или избыточно экспрессируются в опухолях в сравнении с панелью нормальных тканей (+). Фоновый уровень данного балла рассчитывали по измерениям для

следующих соответствующих нормальных тканей: клетки крови, кровеносные сосуды, ткань головного мозга, сердца, печени, легких, жировая ткань, ткань надпочечника, желчного протока, мочевого пузыря, костного мозга, хрящевая ткань, ткань пищевода, глаза, желчного пузыря, головы и шеи, толстой кишки, тонкой кишки, почки, лимфатического узла, центрального нерва, периферического нерва, поджелудочной железы, паращитовидной железы, брюшины, гипофиза, плевры, скелетных мышц, кожи, спинного мозга, селезенки, желудка, щитовидной железы, трахеи, мочеточника.

В случае, если в наличии имелись данные для нескольких образцов одного и того же вида ткани, для расчетов использовали среднее арифметическое всех соответствующих образцов.

SEQ ID No	Последовательность	Экспрессия гена
3	FLLVPSPIWQL	+
5	LVWEVVESV	+
9	FLQEGDLISV	+
10	SLLDKLSGI	++
14	LLIEVSEEL	++
17	VLWDLRPSSLI	++
18	KMMTFFQGL	+
19	MLLPWLPKL	+
24	TLTSLNILL	+
31	VVLPVITL	+
32	VLSVSAVLGA	++
33	FASERPPSV	+++
34	LLNVEPAGA	++
35	VLLNSNYPV	+++
36	FQVTRTTGV	+++
37	KILDEFYNV	++
38	SLSAWLPSL	+++
39	YIYEDEVRL	+++
40	FTLPFLVNL	++
41	LMASEGIWESSL	++
42	WITPVIPAL	+
43	AIWSTILIA	++++
44	WLIPRQLAAA	++++
46	AMVEIIPKV	+

SEQ ID No	Последовательность	Экспрессия гена
47	ALLPGVPGL	++
48	MLAEIHPKA	++
49	FLWDPRDVVL	++
51	GLLTQVHIL	++
52	LAFVSHVLI	+++
53	TISISLSSV	++
54	GLSPDQVFL	++
56	IITNLIVNI	++++
57	YVLMTSLLL	+++
59	LAASTTFLGV	++
60	LLLATLENL	+
62	SLLGKPGLTI	++
63	LSFKRSLSI	++
64	LLLALRLSL	+++
65	IAISQLTFV	++++
66	ILNELLNSI	+
67	ALKELMGPA	++
68	KLLADAFKV	+++
69	LLCPVVLQL	+++
70	LLLQIEPAA	+++
71	WLMPVMPAL	++

ПРИМЕР 3:

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

Для получения информации об иммуногенности пептидов TUMAP по настоящему изобретению заявители провели исследования с использованием прайминга Т-клеток *in vitro* на основе повторных стимуляций CD8+ Т-клеток искусственными антигенпрезентирующими клетками (иАПК), нагруженными комплексами пептид-МНС и антителом к CD28. Таким образом заявители могли показать иммуногенность для рестриктированных по HLA-A*02:01 пептидов TUMAP по изобретению, демонстрируя, что эти пептиды являются Т-клеточными эпитопами, против которых у человека имеются CD8+ Т-клетки-предшественники (Таблица 13а и 13б).

Прайминг CD8+ Т-клеток *in vitro*

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

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

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

Очищенный костимуляторный IgG2a мыши к антителам человека CD28 Ab 9.3 (Jung et al., 1987) был химически биотинилирован с использованием сульфо-N-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. 104) из модифицированного Melan-A/MART-1) и A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI из DDX5, SEQ ID NO. 105), 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 дней при 37°C. Половина среды была затем заменена на свежую среду TCM с добавлением 80 Ед/мл ИЛ-2, и инкубация была продолжена в течение 4 дней при 37°C. Данный цикл стимуляций производили в общей сложности три раза. Для считывания с pMHC-мультимеров использовали 8 различных молекул pMHC на цикл. Использовался двумерный комбинаторный подход к кодировке, как было описано ранее (Andersen et al., 2012) с незначительными изменениями, относящимися к мечению с 5 различными флуорохромами. Наконец, проводили анализ мультимеров посредством окрашивания клеток набором для определения жизнеспособности клеток при воздействии ближнего ИК-излучения с красителем Live/dead (Invitrogen, Карлсруэ, Германия), клоном SK1 антител CD8-FITC (BD, Гейдельберг, Германия) и мультимерами 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 острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, рака пищеводно-желудочного перехода, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легких, карциномы мочевого пузыря и рака эндометрия матки

Для проанализированных пептидов, связанных с молекулами HLA I класса, иммуногенность *in vitro* могла быть продемонстрирована генерированием пептид-специфических Т-клеточных линий. Типичные результаты проточного цитометрического анализа после TUMAP-специфического окрашивания мультимерами для 7 пептидов по изобретению показаны на Фигурах 3А и 3В и Фигуре 4А-Е вместе с соответствующими отрицательными контролями. Результаты для 30 пептидов по изобретению обобщаются в Таблице 13а и 13б.

Таблица 13а: Иммуногенность *in vitro* пептидов HLA I класса по изобретению

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

SEQ ID No	Последовательность	Положительные лунки [%]
102	GLDPTQFRV	++++
103	SLVSYLDKV	+

Таблица 13б: Иммуногенность *in vitro* пептидов HLA I класса по изобретению

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

SEQ ID No	Последовательность	Положительные лунки [%]
1	KLLDFSTRI	+
2	ALLDVLVKL	+
3	FLLVPSPIWQL	+
4	YLGDSHVLL	+
6	ALHDSPVYL	++
7	ALWEEVKATSL	+
13	FLDEGSLLRL	+
18	KMMTFFQGL	++++
19	MLLPWLPKL	+++
26	KLWTSLVNL	+++
29	LLWEFPSMA	++
31	VVLPIVITL	++
33	FASERPPSV	+++
36	FQVTRTTGV	+
37	KILDEFYNV	+++
38	SLSAWLPSL	+
40	FTLPFLVNL	+++
46	AMVEIIPKV	+
47	ALLPGVPGL	++
48	MLAEIHPKA	+++
49	FLWDPRDVVL	+
50	GLASYLDRV	+
51	GLLTQVHIL	+
65	IAISQLTFV	+
68	KLLADAFKV	++++
74	TLLSYSIPL	+
96	KIIEDLANTV	++
101	KLPEGHLPEV	+

ПРИМЕР 4:

Синтез пептидов

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

и чистоту каждого отдельного пептида определяли с помощью масс-спектрометрии и аналитической ОФ ВЭЖХ. Были получены пептиды в виде белого или грязно-белого лиофилизата (соль трифторацетата) со степенью чистоты >50%. Все пептиды TUMAP предпочтительно вводят в виде солей трифторацетатов или ацетатов, возможны также другие солевые формы.

ПРИМЕР 5:

Анализ связывания МНС

Пептиды-кандидаты для Т-клеточной терапии в соответствии с настоящим изобретением далее были испытаны на их способность связываться с МНС (аффинность). Результаты для 79 пептидов по изобретению обобщаются в Таблице 14.

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

В 96-луночные планшеты MAXISorp (NUNC) на ночь вносили 2 мкг/мл стрептавидина в PBS при комнатной температуре, промывали 4 раза и блокировали в течение 1 часа при 37°C в блокирующем буфере с 2% БСА. Полученные в результате рефолдинга мономеры HLA-A*02:01/MLA-001 служили в качестве стандарта, покрывающего диапазон 15-500 нг/мл. Мономерные комплексы пептид-МНС после реакции обмена под воздействием УФ-излучения 100-кратно разводили в блокирующем буфере. Образцы инкубировали в течение 1 ч при 37°C, промывали

четыре раза, инкубировали в течение 1 ч при 37°C с 2 мкг/мл пероксидазы хрена, конъюгированной с антителом к $\beta 2m$, снова промывали и проводили обнаружение с помощью раствора ТМБ; реакцию останавливали NH_2SO_4 . Величину поглощения измеряли при длине волны 450 нм. Пептиды-кандидаты, которые демонстрировали высокий выход реакции обмена (предпочтительно более 50%, наиболее предпочтительно, более 75%) обычно являются предпочтительными для генерирования и получения антител или их фрагментов и/или Т-клеточных рецепторов или их фрагментов, поскольку они проявляют достаточную avidность по отношению к молекулам МНС и предотвращают диссоциацию комплексов МНС.

Таблица 14: Показатели связывания с молекулами МНС I класса. Связывание рестриктированных по молекулам HLA I класса пептидов с HLA-A*02:01 распределено по выходу пептидного обмена: $\geq 10\% = +$; $\geq 20\% = ++$; $\geq 50 = +++$; $\geq 75\% = ++++$

SEQID No	Последовательность	Пептидный обмен
1	KLLDFSTRI	++++
2	ALLDVLVKL	++++
3	FLLVPSPIWQL	++++
4	YLGDSHVLL	++++
5	LVWEVVESV	++++
6	ALHDSPVYL	++++
7	ALWEEVKATSL	++++
8	ILQSLVPAA	++++
9	FLQEGDLISV	++++
10	SLLDKLSGI	++++
11	ALLPHAPEAV	+++
12	HLDSMNVSI	++++
13	FLDEGSLLRL	++++
14	LLIEVSEEL	++++
15	NLVMPLLHI	++
16	ALLDAEQSPVAL	++++
17	VLWDLRPSSLI	++++
18	KMMTFFQGL	++++
19	MLLPWLPKL	++++
20	VLISLPGKV	++
21	FVFISPSFL	+++
22	SLYDVPVGA	++++

SEQID No	Последовательность	Пептидный обмен
23	GLEVLDALL	++
24	TLTSLNILL	++++
25	ISVLNLSAI	++
26	KLWTSLVNL	++++
27	IAAGVPNTDA	++
28	SQLEKPETA	+++
29	LLWEFPSMA	++++
30	LLRLTLLPL	++
31	VVLPVITL	++++
32	VLSVSAVLGA	+++
33	FASERPPSV	++++
34	LLNVEPAGA	++++
35	VLLNSNYPV	++++
36	FQVTRTTGV	++++
37	KILDEFYNV	++++
38	SLSAWLPSL	++++
39	YIYEDEVRL	++++
40	FTLPFLVNL	++++
41	LMASEGIWESSL	+++
42	WITPVIPAL	++++
43	AIWSTILIA	++
44	WLIPRQLAAA	++++
45	ALYHQSPLL	++++
46	AMVEIIPKV	++++
47	ALLPGVPGL	++++
48	MLAEIHPKA	++++
49	FLWDPRDVVL	++++
50	GLASYLDRV	++++
51	GLLTQVHIL	++++
52	LAFVSHVLI	++
53	TISISLSSV	++++
54	GLSPDQVFL	++++
55	MVQQEKLFV	+++
56	IITNLIVNI	+++
57	YVLMTSLLL	++++
58	MIISHRALEL	++
59	LAASTTFLGV	++++
60	LLLATLENL	++++
61	VLPWQPLLL	++
62	SLLGKPGLTI	++++

SEQID No	Последовательность	Пептидный обмен
63	LSFKRSLSI	++
64	LLLALRLSL	+
65	IAISQLTFV	++++
66	ILNELLNSI	++++
67	ALKELMGPA	++
68	KLLADAFKV	++++
69	LLCPVVLQL	++++
70	LLLQIEPAA	++++
71	WLMPVMPAL	++++
73	STTIINLIL	++
74	TLLSYSIPL	++++
96	KIIEDLANTV	++++
97	GLIDDKGTIKL	++++
98	SLMEVTHDL	++++
99	ALMDGSESRFFV	++++
100	SLGPPVGV	++++
101	KLPEGHLPEV	++++

ПРИМЕР 6:

Абсолютное количественное определение опухолеассоциированных пептидов, презентруемых на поверхности клетки

Получение связывающих компонентов, таких как антитела и/или ТКР, является трудоемким процессом, который может проводиться лишь для ряда выбранных мишеней. В случае опухолеассоциированных и -специфических пептидов, критерии отбора включали, но не были ограничены ими, исключительностью презентации и плотностью пептида, презентруемого на поверхности клеток. В дополнение к выделению и относительному количественному определению пептидов, описанных в Примере 1, заявители анализировали абсолютное число копий пептида на клетку в соответствии с описанием заявки WO 2016/107740. Определение числа копий TUMAP на клетку в образцах солидных опухолей требует абсолютного количественного определения выделенного пептида TUMAP, эффективности процесса выделения TUMAP и числа клеток проанализированного образца ткани.

Количественное определение пептида с помощью наноЖХ-МС/МС

Для точного количественного определения пептидов методом масс-спектрометрии проводили построение калибровочной кривой для каждого пептида при использовании двух вариантов пептида с разными изотопными метками (одна или две аминокислоты с изотопными метками были включены во время синтеза пептида TUMAP). От опухолеассоциированного пептида эти варианты с изотопными метками отличаются лишь по своей массе, но не имеют различий в других физико-химических свойствах (Anderson et al., 2012). Для построения калибровочной кривой для пептидов было произведено несколько измерений с помощью наноЖХ-МС/МС, чтобы определить соотношение сигналов МС/МС титрованных (пептид с одной изотопной меткой) и пептидов с константной (пептид с двойной изотопной меткой) изотопной меткой.

Пептид с двойной изотопной меткой, называемый также внутренним стандартом, добавляли далее в известном количестве в каждый образец для МС, и все МС-сигналы были нормализованы относительно МС-сигнала внутреннего стандарта, чтобы сгладить потенциальные технические вариации МС-экспериментов.

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

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

Эффективность выделения комплексов пептид/МНС

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

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

Определение числа клеток в твердой замороженной ткани

В целях определения числа клеток образцов тканей, подлежащих абсолютному количественному определению пептида, авторы изобретения применяли анализ содержания ДНК. Этот метод применим к широкому диапазону образцов различного происхождения и, что наиболее важно, к замороженным образцам (Alcoser et al., 2011; Forsey and Chaudhuri, 2009; Silva et al., 2013). Во время выполнения протокола выделения образец ткани обрабатывают до получения

гомогенного лизата, из которого берут небольшую аликвоту лизата. Аликвоту делят на три части, из которых выделяют ДНК (набор QiaAmp DNA Mini Kit, Qiagen, Хильден, Германия). Общее содержание ДНК из каждой процедуры выделения ДНК подвергается количественному определению с помощью количественного анализа ДНК на основе флуоресценции (набор для количественного анализа Qubit dsDNA HS, Life Technologies, Дармштадт, Германия) по меньшей мере на двух повторных циклах.

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

Число копий пептида на одну клетку

С помощью данных перечисленных ранее экспериментов авторы изобретения рассчитали число копий пептидов TUMAP на клетку, разделив общее количество пептида на общее число клеток в образце, а затем поделив на эффективность выделения. Число копий клеток для выбранных пептидов показано в Таблице 15.

Таблица 15: Абсолютное число копий. В таблице указаны результаты абсолютного количественного определения пептидов в опухолевых образцах. Медианное число копий на клетку указано для каждого пептида: $<25 = +$; $\geq 25 = ++$; $\geq 50 = +++$; $\geq 75 = ++++$. Указано число образцов, для которых имеются поддающиеся оценке, высококачественные данные MS.

SEQ ID No.	Код пептида	Число копий на клетку (медиана)	Количество образцов
1	NUDCD2-001	+++	8
2	COLPDG-001	++++	12
4	altORF-002	+	7
5	altORF-003	++++	13
6	altORF-004	+	23
7	altORF-005	+	1
8	altORF-006	++++	12
9	altORF-007	++	11
10	altORF-008	+	11
11	altORF-009	+	13
39	altORF-037	++	4
96	KRT18-001	++	1
97	CDC2-006	++	10
100	CIZ1-001	+	1

Список цитируемой литературы

Reference List

Accardi, L. et al., *Int.J Cancer* **134** (2014): 2742-2747

Aken, B. L. et al., *Database.(Oxford)* **2016** (2016)

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

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

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

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

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

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

Anderson, D. M. et al., *Cell* **160** (2015): 595-606

Anderson, N. L. et al., *J Proteome.Res* **11** (2012): 1868-1878

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

- Armitage, J. O., *Blood* **110** (2007): 29-36
- Aspden, J. L. et al., *Elife*. **3** (2014): e03528
- Avigan, D. et al., *Clin Cancer Res.* **10** (2004): 4699-4708
- Azevedo, R. et al., *J Control Release* **214** (2015): 40-61
- Banchereau, J. et al., *Cell* **106** (2001): 271-274
- Beatty, G. et al., *J Immunol* **166** (2001): 2276-2282
- Beggs, J. D., *Nature* **275** (1978): 104-109
- Benjamini, Y. et al., *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, **Vol.57** (1995): 289-300
- Berman, R. S. et al., National Cancer Institute: PDQ(R) Colon Cancer Treatment (2015a)
- Berman, R. S. et al., National Cancer Institute: PDQ(R) Rectal Cancer Treatment (2015b)
- Boulter, J. M. et al., *Protein Eng* **16** (2003): 707-711
- Braumuller, H. et al., *Nature* (2013)
- Bray, F. et al., *Int J Cancer* **132** (2013): 1133-1145
- Bridgewater, J. et al., *J Hepatol.* **60** (2014): 1268-1289
- Brossart, P. et al., *Blood* **90** (1997): 1594-1599
- Bruckdorfer, T. et al., *Curr.Pharm.Biotechnol.* **5** (2004): 29-43
- Bujas, T. et al., *Eur.J Histochem.* **55** (2011): e7
- Butterfield, L. H. et al., *Clin.Cancer Res.* **12** (2006): 2817-2825
- Butterfield, L. H. et al., *Clin.Cancer Res.* **9** (2003): 5902-5908
- Byrd, J. C. et al., *N.Engl.J Med.* **369** (2013): 32-42
- Carballido, E. et al., *Cancer Control* **19** (2012): 54-67
- Card, K. F. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* **53** (2004): 345-357
- Chang, Y. S. et al., *Cancer Chemother.Pharmacol.* **59** (2007): 561-574
- Chapiro, J. et al., *Radiol.Med.* **119** (2014): 476-482
- ClinicalTrials.gov, (2015), <http://www.clinicaltrials.gov>

- Cohen, C. J. et al., *J Mol.Recognit.* **16** (2003a): 324-332
- Cohen, C. J. et al., *J Immunol.* **170** (2003b): 4349-4361
- Cohen, S. N. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **69** (1972): 2110-2114
- Coligan, J. E. et al., *Current Protocols in Protein Science* (1995)
- Colombetti, S. et al., *J Immunol.* **176** (2006): 2730-2738
- Coosemans, A. et al., *Anticancer Res* **33** (2013): 5495-5500
- Counter, C. M. et al., *Blood* **85** (1995): 2315-2320
- de, Klerk E. et al., *Trends Genet.* **31** (2015): 128-139
- Dedes, K. J. et al., *Sci.Transl.Med.* **2** (2010): 53ra75
- Dengjel, J. et al., *Clin Cancer Res* **12** (2006): 4163-4170
- Denkberg, G. et al., *J Immunol.* **171** (2003): 2197-2207
- Economopoulou, P. et al., *Ann.Transl.Med.* **4** (2016): 173
- Eichhorst, B. F. et al., *Blood* **107** (2006): 885-891
- Emens, L. A., *Expert.Rev.Anticancer Ther.* **12** (2012): 1597-1611
- Enguita-German, M. et al., *World J Hepatol.* **6** (2014): 716-737
- Estey, E. H., *Am.J Hematol.* **89** (2014): 1063-1081
- Falk, K. et al., *Nature* **351** (1991): 290-296
- Ferlay et al., *GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No.11 [Internet]*, (2013), <http://globocan.iarc.fr>
- Follenzi, A. et al., *Nat Genet.* **25** (2000): 217-222
- Fong, L. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98** (2001): 8809-8814
- Forsey, R. W. et al., *Biotechnol.Lett.* **31** (2009): 819-823
- Fuge, O. et al., *Res Rep.Urol.* **7** (2015): 65-79
- Furman, R. R. et al., *N.Engl.J Med.* **370** (2014): 997-1007
- Gabrilovich, D. I. et al., *Nat.Med* **2** (1996): 1096-1103
- Gandhi, A. V. et al., *Ann Surg.Oncol* **20 Suppl 3** (2013): S636-S643

- Gattinoni, L. et al., *Nat.Rev.Immunol.* **6** (2006): 383-393
- Giannopoulos, K. et al., *Leukemia* **24** (2010): 798-805
- Giannopoulos, K. et al., *Int.J Oncol* **29** (2006): 95-103
- Gnjatic, S. et al., *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100** (2003): 8862-8867
- Godkin, A. et al., *Int.Immunol* **9** (1997): 905-911
- Goede, V. et al., *N.Engl.J Med.* **370** (2014): 1101-1110
- Gonzalez-Cao, M. et al., *Cancer Biol Med* **13** (2016): 483-488
- Gragert, L. et al., *Hum.Immunol.* **74** (2013): 1313-1320
- Granziero, L. et al., *Blood* **97** (2001): 2777-2783
- Green, J. et al., *Cochrane.Database.Syst.Rev* (2005): CD002225
- Green, M. R. et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* **4th** (2012)
- Greenfield, E. A., *Antibodies: A Laboratory Manual* **2nd** (2014)
- Grivas, P. D. et al., *Semin.Cancer Biol* **35** (2015): 125-132
- Gunawardana, C. et al., *Br.J Haematol.* **142** (2008): 606-609
- Gustafsson, C. et al., *Trends Biotechnol.* **22** (2004): 346-353
- Hallek, Michael et al., *ASH Annual Meeting Abstracts* **112** (2008): 325
- Harig, S. et al., *Blood* **98** (2001): 2999-3005
- Hinrichs, C. S. et al., *Nat Biotechnol.* **31** (2013): 999-1008
- Holtl, L. et al., *Clin.Cancer Res.* **8** (2002): 3369-3376
- Horig, H. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* **49** (2000): 504-514
- Hung, C. F. et al., *Immunol.Rev* **222** (2008): 43-69
- Hus, I. et al., *Oncol Rep.* **20** (2008): 443-451
- Hwang, M. L. et al., *J Immunol.* **179** (2007): 5829-5838
- Inoue, H. et al., *Int.J Cancer* **63** (1995): 523-526
- Jones, R. T. et al., *Urol.Clin North Am.* **43** (2016): 77-86

- Jung, G. et al., Proc Natl Acad Sci U S A **84** (1987): 4611-4615
- Kalos, M. et al., Sci.Transl.Med **3** (2011): 95ra73
- Kanthan, R. et al., J Oncol **2015** (2015): 967472
- Kassiotis, G. et al., Philos.Trans.R Soc.Lond B Biol Sci. **372** (2017)
- Kaufman, H. L. et al., Clin Cancer Res. **14** (2008): 4843-4849
- Khoury, G. A. et al., Sci.Rep. **1** (2011)
- Kibbe, A. H., Handbook of Pharmaceutical Excipients **rd** (2000)
- Kimura, H. et al., Int.J Oncol **30** (2007): 171-179
- Knollman, H. et al., Ther.Adv.Urol. **7** (2015a): 312-330
- Knollman, H. et al., Ther.Adv.Urol. **7** (2015b): 312-330
- Koido, S. et al., World J Gastroenterol. **19** (2013): 8531-8542
- Kono, K. et al., Cancer Sci. **100** (2009): 1502-1509
- Krackhardt, A. M. et al., Blood **100** (2002): 2123-2131
- Krieg, A. M., Nat.Rev.Drug Discov. **5** (2006): 471-484
- Krishnamurthy, J. et al., Clin Cancer Res **21** (2015): 3241-3251
- Kronenberger, K. et al., J Immunother. **31** (2008): 723-730
- Kuball, J. et al., Blood **109** (2007): 2331-2338
- Laumont, C. M. et al., Cell Mol.Life Sci. **75** (2018): 607-621
- Lee, W. C. et al., J Immunother. **28** (2005): 496-504
- Leitlinie Endometriumkarzinom, **032/034**, (2008)
- Leitlinie Magenkarzinom, **032-009OL**, (2012)
- Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, **030/099**, (2014)
- Li, Y. et al., Cancer Epidemiol. **39** (2015): 8-13
- Liang, Z. et al., Zhonghua Zhong.Liu Za Zhi. **27** (2005): 534-537
- Liddy, N. et al., Nat.Med. **18** (2012): 980-987

- Liepe, J. et al., *Science* **354** (2016): 354-358
- Ljunggren, H. G. et al., *J Exp.Med* **162** (1985): 1745-1759
- Llovet, J. M. et al., *N.Engl.J Med.* **359** (2008): 378-390
- Longenecker, B. M. et al., *Ann N.Y.Acad.Sci.* **690** (1993): 276-291
- Lonsdale, J., *Nat.Genet.* **45** (2013): 580-585
- Lukas, T. J. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **78** (1981): 2791-2795
- Lukka, H. et al., *Clin Oncol (R Coll.Radiol.)* **14** (2002): 203-212
- Lundblad, R. L., *Chemical Reagents for Protein Modification* **3rd** (2004)
- Mantia-Smaldone, G. M. et al., *Hum.Vaccin.Immunother.* **8** (2012): 1179-1191
- Marten, A. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* **51** (2002): 637-644
- Massari, F. et al., *Cancer Treat.Rev.* **41** (2015): 114-121
- Matsueda, S. et al., *World J Gastroenterol.* **20** (2014): 1657-1666
- Maus, M. V. et al., *Blood* **123** (2014): 2625-2635
- Mayr, C. et al., *Exp.Hematol.* **34** (2006): 44-53
- Mayr, C. et al., *Blood* **105** (2005): 1566-1573
- Meziere, C. et al., *J Immunol* **159** (1997): 3230-3237
- Miyagi, Y. et al., *Clin.Cancer Res.* **7** (2001): 3950-3962
- Molina, J. R. et al., *Mayo Clin Proc.* **83** (2008): 584-594
- Morgan, R. A. et al., *Science* **314** (2006): 126-129
- Mortara, L. et al., *Clin Cancer Res.* **12** (2006): 3435-3443
- Moulton, H. M. et al., *Clin Cancer Res.* **8** (2002): 2044-2051
- Mueller, L. N. et al., *J Proteome.Res.* **7** (2008): 51-61
- Mueller, L. N. et al., *Proteomics.* **7** (2007): 3470-3480
- Muller, M. R. et al., *Blood* **103** (2004): 1763-1769
- Mumberg, D. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96** (1999): 8633-8638

- Nam, J. W. et al., *Mol.Cells* **39** (2016): 367-374
- National Cancer Institute, (6-5-2015), www.cancer.gov
- National Cancer Institute (NCI), (1-19-2011),
<http://www.cancer.gov/cancertopics/wyntk/kidney/page3>
- Nilsen, T. W. et al., *Nature* **463** (2010): 457-463
- O'Brien, S. et al., *Lancet Oncol* **15** (2014): 48-58
- O'Leary, N. A. et al., *Nucleic Acids Res* **44** (2016): D733-D745
- Ohigashi, Y. et al., *Clin Cancer Res.* **11** (2005): 2947-2953
- Okuno, K. et al., *Exp.Ther.Med.* **2** (2011): 73-79
- Olexiouk, V. et al., *Nucleic Acids Res* **44** (2016): D324-D329
- Palma, M. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* **57** (2008): 1705-1710
- Palmer, D. H. et al., *Hepatology* **49** (2009): 124-132
- Palomba, M. L., *Curr.Oncol Rep.* **14** (2012): 433-440
- Parikh, S. A. et al., *Blood* **118** (2011): 2062-2068
- Phan, G. Q. et al., *Cancer Control* **20** (2013): 289-297
- Pinheiro, J. et al., *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models* (<http://CRAN.R-project.org/package=nlme>) (2015)
- Plebanski, M. et al., *Eur.J Immunol* **25** (1995): 1783-1787
- Porta, C. et al., *Virology* **202** (1994): 949-955
- Porter, D. L. et al., *N.Engl.J Med.* **365** (2011): 725-733
- Quillien, V. et al., *Anticancer Res.* **17** (1997): 387-391
- Quinn, D. I. et al., *Urol.Oncol* **33** (2015): 245-260
- Rakic, M. et al., *Hepatobiliary.Surg.Nutr.* **3** (2014): 221-226
- Rammensee, H. G. et al., *Immunogenetics* **50** (1999): 213-219
- Reinisch, W. et al., *J Immunother.* **25** (2002): 489-499
- Reinmuth, N. et al., *Dtsch.Med.Wochenschr.* **140** (2015): 329-333

- Richards, S. et al., *J Natl.Cancer Inst.* **91** (1999): 861-868
- Rini, B. I. et al., *Curr.Opin.Oncol.* **20** (2008): 300-306
- Rini, B. I. et al., *Cancer* **107** (2006): 67-74
- Robak, T. et al., *Expert.Opin.Biol.Ther* **14** (2014): 651-661
- Rock, K. L. et al., *Science* **249** (1990): 918-921
- Rodenko, B. et al., *Nat.Protoc.* **1** (2006): 1120-1132
- Rouanne, M. et al., *Crit Rev Oncol Hematol.* **98** (2016): 106-115
- Rucki, A. A. et al., *World J Gastroenterol.* **20** (2014): 2237-2246
- S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, **032-010OL**, (2013)
- S3-Leitlinie Lungenkarzinom, **020/007**, (2011a)
- S3-Leitlinie Lungenkarzinom, **020/007**, (2011b)
- S3-Leitlinie maligne Ovarialtumore, **032-035OL**, (2013)
- S3-Leitlinie Mammakarzinom, **032-045OL**, (2012)
- S3-Leitlinie Melanom, **032-024OL**, (2013)
- S3-Leitlinie Prostatakarzinom, **043/022OL**, (2014)
- S3-Leitlinie Zervixkarzinom, **032/033OL**, (2014)
- Saiki, R. K. et al., *Science* **239** (1988): 487-491
- Salman, B. et al., *Oncoimmunology.* **2** (2013): e26662
- Sangro, B. et al., *J Clin.Oncol.* **22** (2004): 1389-1397
- Schetelig, J. et al., *J Clin Oncol* **26** (2008): 5094-5100
- Schiavetti, F. et al., *Cancer Res* **62** (2002): 5510-5516
- Schmidt, S. M. et al., *Cancer Res.* **64** (2004): 1164-1170
- Schmitt, T. M. et al., *Hum.Gene Ther.* **20** (2009): 1240-1248
- Scholten, K. B. et al., *Clin Immunol.* **119** (2006): 135-145
- Seeger, F. H. et al., *Immunogenetics* **49** (1999): 571-576

- Sherman, F. et al., Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics (1986)
- Shi, M. et al., World J Gastroenterol. **10** (2004): 1146-1151
- Showel, M. M. et al., F1000Prime.Rep. **6** (2014): 96
- Siegel, S. et al., Blood **102** (2003): 4416-4423
- Silva, L. P. et al., Anal.Chem. **85** (2013): 9536-9542
- Singh-Jasuja, H. et al., Cancer Immunol.Immunother. **53** (2004): 187-195
- Small, E. J. et al., J Clin Oncol. **24** (2006): 3089-3094
- Spaner, D. E. et al., Cancer Immunol.Immunother. **54** (2005): 635-646
- Srivastava, N. et al., Cancer Manag.Res. **6** (2014): 279-289
- Stahl, M. et al., Ann.Oncol. **24 Suppl 6** (2013): vi51-vi56
- Steinberg, R. L. et al., Urol.Oncol (2016a)
- Steinberg, R. L. et al., Urol.Oncol (2016b)
- Stevanovic, S. et al., J Clin Oncol **33** (2015): 1543-1550
- Stintzing, S., F1000Prime.Rep. **6** (2014): 108
- Sturm, M. et al., BMC.Bioinformatics. **9** (2008): 163
- Su, Z. et al., Cancer Res. **63** (2003): 2127-2133
- Subramanian, R. P. et al., Retrovirology. **8** (2011): 90
- Takayama, T. et al., Cancer **68** (1991): 2391-2396
- Takayama, T. et al., Lancet **356** (2000): 802-807
- Tanaka, F. et al., Int.J Oncol **10** (1997): 1113-1117
- Teufel, R. et al., Cell Mol.Life Sci. **62** (2005): 1755-1762
- Thakkar, J. P. et al., Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev. **23** (2014): 1985-1996
- Toh, U. et al., Int.J Clin Oncol **7** (2002): 372-375
- Toh, U. et al., Clin Cancer Res. **6** (2000): 4663-4673
- Toomey, P. G. et al., Cancer Control **20** (2013): 32-42

- Tran, E. et al., *Science* **344** (2014): 641-645
- Vanderperre, B. et al., *PLoS.One.* **8** (2013): e70698
- Vici, P. et al., *J Exp.Clin Cancer Res* **33** (2014): 29
- Von Hoff, D. D. et al., *N.Engl.J Med.* **369** (2013): 1691-1703
- von Rundstedt, F. C. et al., *Transl.Androl Urol.* **4** (2015): 244-253
- Walter, S. et al., *J.Immunol.* **171** (2003): 4974-4978
- Walter, S. et al., *Nat Med.* **18** (2012): 1254-1261
- Wang, N. et al., *Arch.Gynecol.Obstet.* **283** (2011): 103-108
- Wierda, W. G. et al., *Blood* **118** (2011): 5126-5129
- Wilhelm, S. M. et al., *Cancer Res.* **64** (2004): 7099-7109
- Willcox, B. E. et al., *Protein Sci.* **8** (1999): 2418-2423
- Wilson, P. M. et al., *Nat Rev.Clin Oncol* **11** (2014): 282-298
- Wittig, B. et al., *Hum.Gene Ther.* **12** (2001): 267-278
- World Cancer Report, (2014)
- World Health Organization, (2014), <http://www.who.int/en/>
- Zaremba, S. et al., *Cancer Res.* **57** (1997): 4570-4577
- Zufferey, R. et al., *J Virol.* **73** (1999): 2886-2892

ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ ДЛЯ ВЫДЕЛЕННОЙ ЗАЯВКИ

1. Пептид, имеющий длину до 30 аминокислот и включающий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 39, где указанный вариант связывается с молекулой(ами) главного комплекса гистосовместимости МНС и/или индуцирует перекрестную реакцию Т-клеток с указанным пептидом, или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Пептид в соответствии с п. 1, где указанный пептид, когда он связан с указанной молекулой МНС, в состоянии распознаваться Т-клетками CD4 и/или CD8.

3. Пептид в соответствии с любым из п. 1 или п. 2, где указанный пептид имеет длину от 8 до 16 аминокислот.

4. Пептид в соответствии с любым из пп. 1–3, где указанный пептид модифицирован и/или включает непептидные связи.

5. Антитело, в частности растворимое или связанное с мембраной антитело, предпочтительно моноклональное антитело или его фрагмент, которое специфически распознает пептид в соответствии с любым из пп. 1–4, предпочтительно пептид в соответствии с любым из пп. 1–4, когда он связан с молекулой МНС.

6. Т-клеточный рецептор, предпочтительно растворимый или связанный с мембраной, или его фрагмент, который реагирует с HLA-лигандом, причем указанный лиганд является пептидом в соответствии с любым из пп. 1–4, предпочтительно пептидом в соответствии с любым из пп. 1–4, когда он связан с молекулой МНС.

7. Т-клеточный рецептор в соответствии с п. 6, где аминокислотная последовательность указанного лиганда состоит из последовательности с SEQ ID No. 39.

8. Т-клеточный рецептор в соответствии с п. 6 или п. 7, где указанный Т-клеточный рецептор представлен в виде растворимой молекулы и, факультативно, обладает дополнительной эффекторной функцией, факультативно – несет иммуностимулирующий домен или токсин.

9. Рекомбинантная клетка-хозяин, включающая пептид в соответствии с любым из пп. 1–4, антитело или его фрагмент в соответствии с п. 5 или Т-клеточный рецептор или его фрагмент в соответствии с п. 6–8, где указанная клетка-хозяин факультативно выбрана из антигенпрезентирующей клетки, факультативно – дендритной клетки, Т-клетки или НК-клетки.

10. Способ получения активированных Т-лимфоцитов *in vitro*, где способ включает контактирование Т-клеток *in vitro* с нагруженными антигеном молекулами МНС человека I или II класса, экспрессированными на поверхности подходящей антигенпрезентирующей

клетки или искусственной конструкции, имитирующей антигенпрезентирующую клетку, в течение периода времени, достаточного для активации указанных Т-клеток антиген-специфическим образом, где указанный антиген является пептидом в соответствии с любым из пп. 1–4.

11. Активированный Т-лимфоцит, полученный с помощью способа в соответствии с п. 10, который селективно распознает клетку, которая презентует полипептид, включающий аминокислотную последовательность, представленную в любом из пп. 1–4.

12. Фармацевтическая композиция, включающая по меньшей мере один активный ингредиент, выбранный из группы, состоящей из пептида в соответствии с любым из пп. 1–4, антитела или его фрагмента в соответствии с п. 5, Т-клеточного рецептора или его фрагмента в соответствии с пп. 6–8, клетки-хозяина в соответствии с п. 9 или активированного Т-лимфоцита в соответствии с п. 11, или конъюгированный или меченный активный ингредиент и фармацевтически приемлемый носитель, а также, факультативно, фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества и/или стабилизаторы.

13. Способ получения пептида в соответствии с любым из пп. 1–4, антитела или его фрагмента в соответствии с п. 5 или Т-клеточного рецептора или его фрагмента в соответствии с пп. 6–8, причем способ включает культивацию клетки-хозяина в соответствии с п. 9 и выделение пептида или его варианта, антитела или его фрагмента или Т-клеточного рецептора или его фрагмента из указанной клетки-хозяина и/или ее культуральной среды.

14. Применение пептида в соответствии с любым из пп. 1–4, антитела или его фрагмента в соответствии с п. 5, Т-клеточного рецептора или его фрагмента в соответствии с пп. 6–8, клетки-хозяина в соответствии с п. 9 или активированного Т-лимфоцита в соответствии с п. 11 в производстве медикамента для лечения ракового заболевания.

15. Применение в соответствии с п. 14, где указанное раковое заболевание выбрано из группы, состоящей из острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, рака пищеводно-желудочного перехода, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, мелкоклеточного рака легких, карциномы мочевого пузыря, рака эндометрия матки и других опухолей, которые демонстрируют избыточную экспрессию белка, из которого получен пептид с последовательностью с SEQ ID No. 39.

16. Комплект, включающий:

а) контейнер, включающий фармацевтическую композицию, содержащую пептид в соответствии с любым из пп. 1–4, антитело или его фрагмент в соответствии с п. 5, Т-клеточный рецептор или его фрагмент в соответствии с пп. 6–8, клетку-хозяина в соответствии с п. 9 или активированный Т-лимфоцит в соответствии с п. 11, в виде раствора или в лиофилизированной форме;

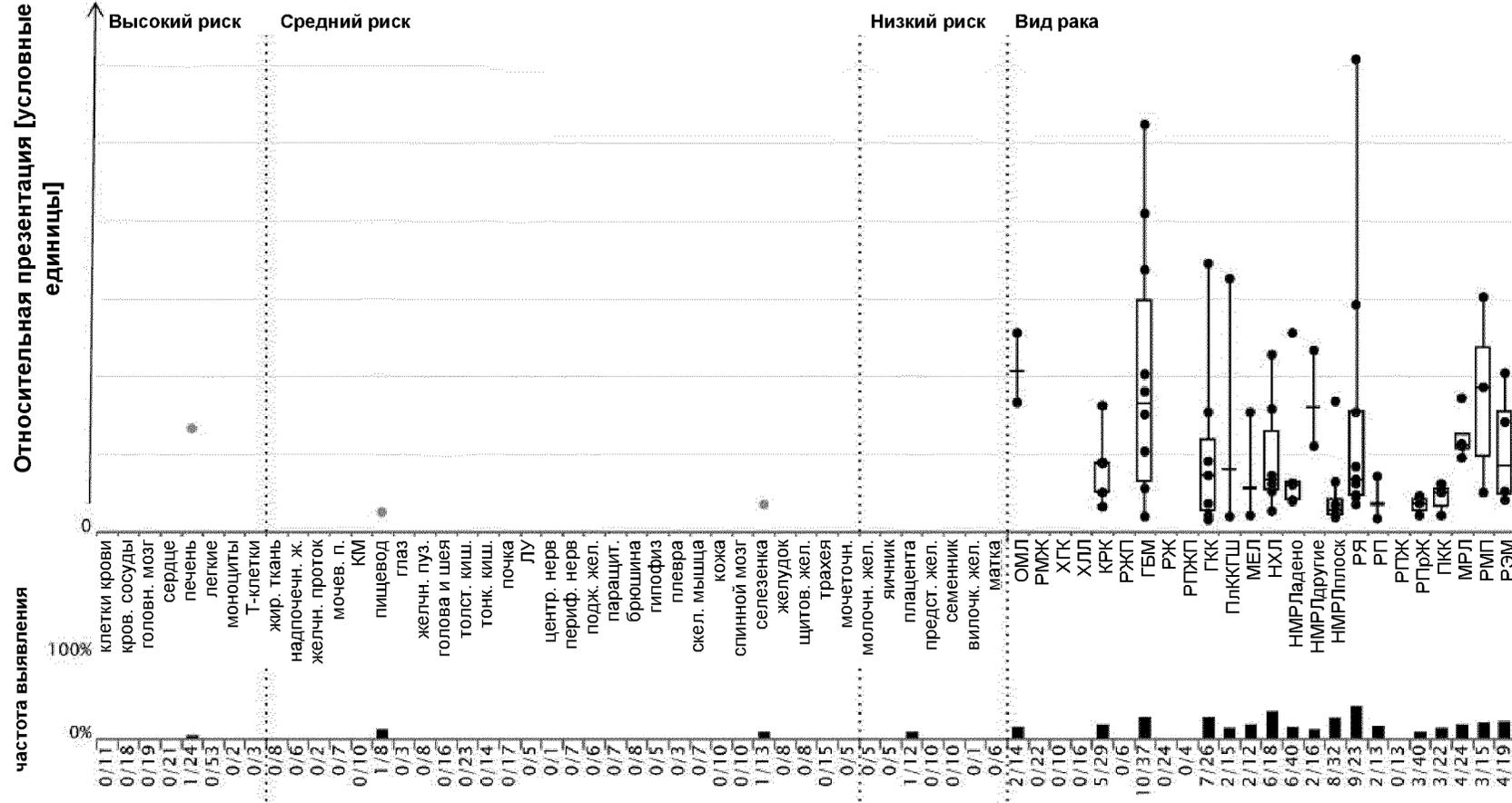
б) факультативно – второй контейнер, содержащий разбавитель или восстанавливающий раствор для лиофилизированного состава; и

в) факультативно – по меньшей мере еще пептиды, выбранные из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 101.

17. Комплект в соответствии с п. 16, дополнительно включающий одно или более из (i) буфера, (ii) разбавителя, (iii) фильтра, (iv) иглы или (v) шприца.

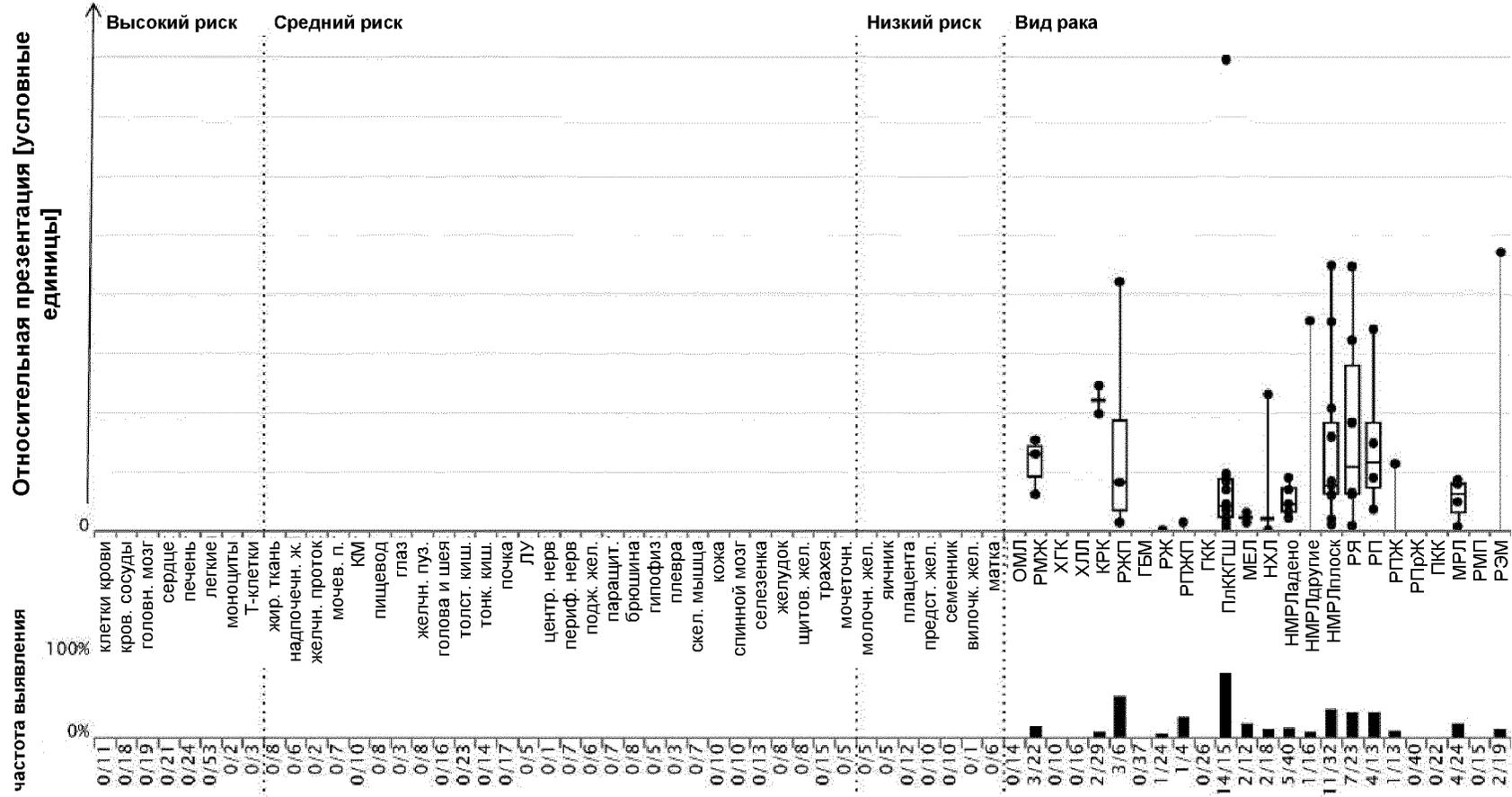
Фигура 1А

Пептид: KLLDFSTRI (A*02)
SEQ ID NO: 1



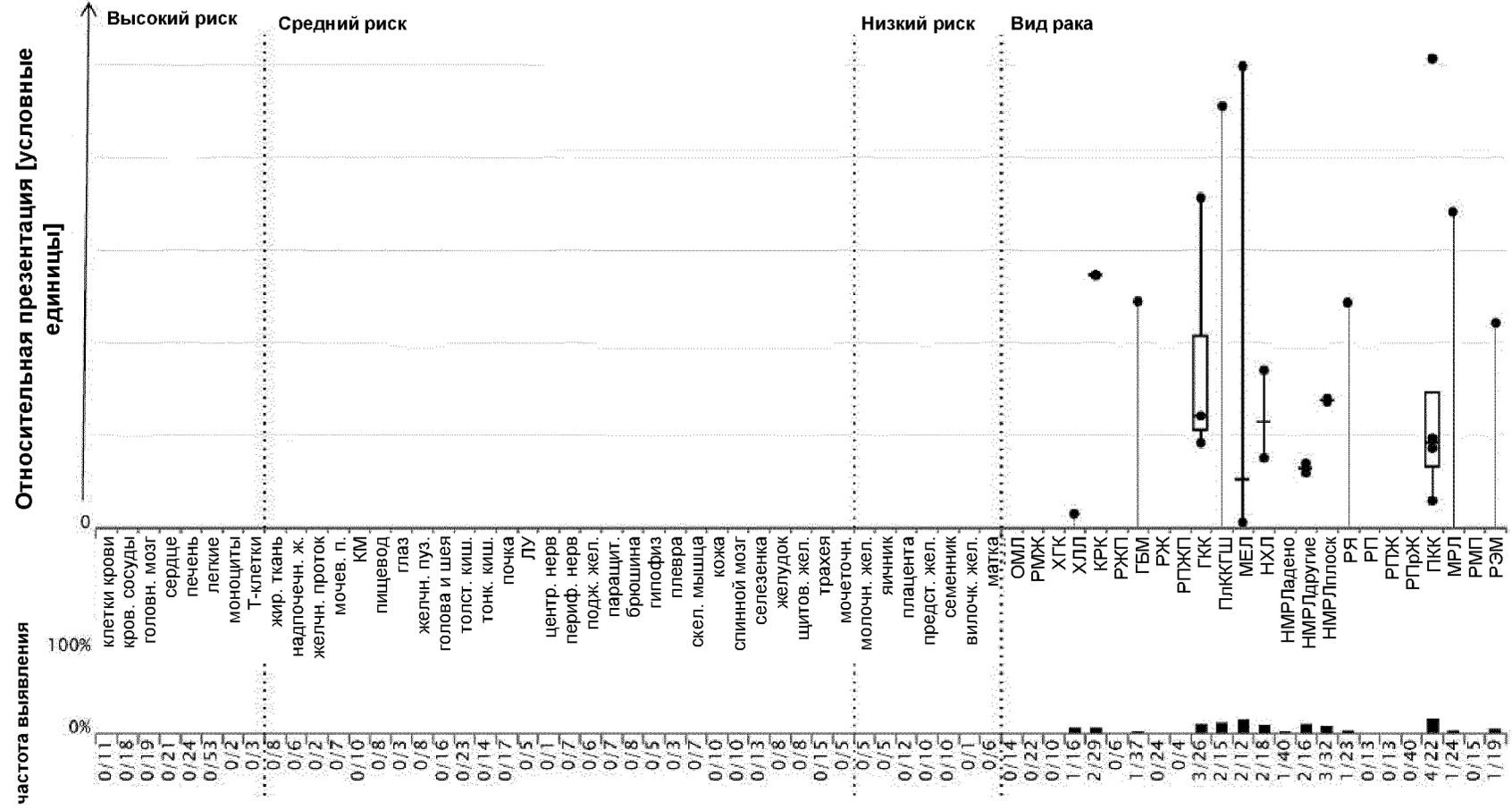
Фигура 1В

Пептид: ALLDVLVKL (A*02)
SEQ ID NO: 2



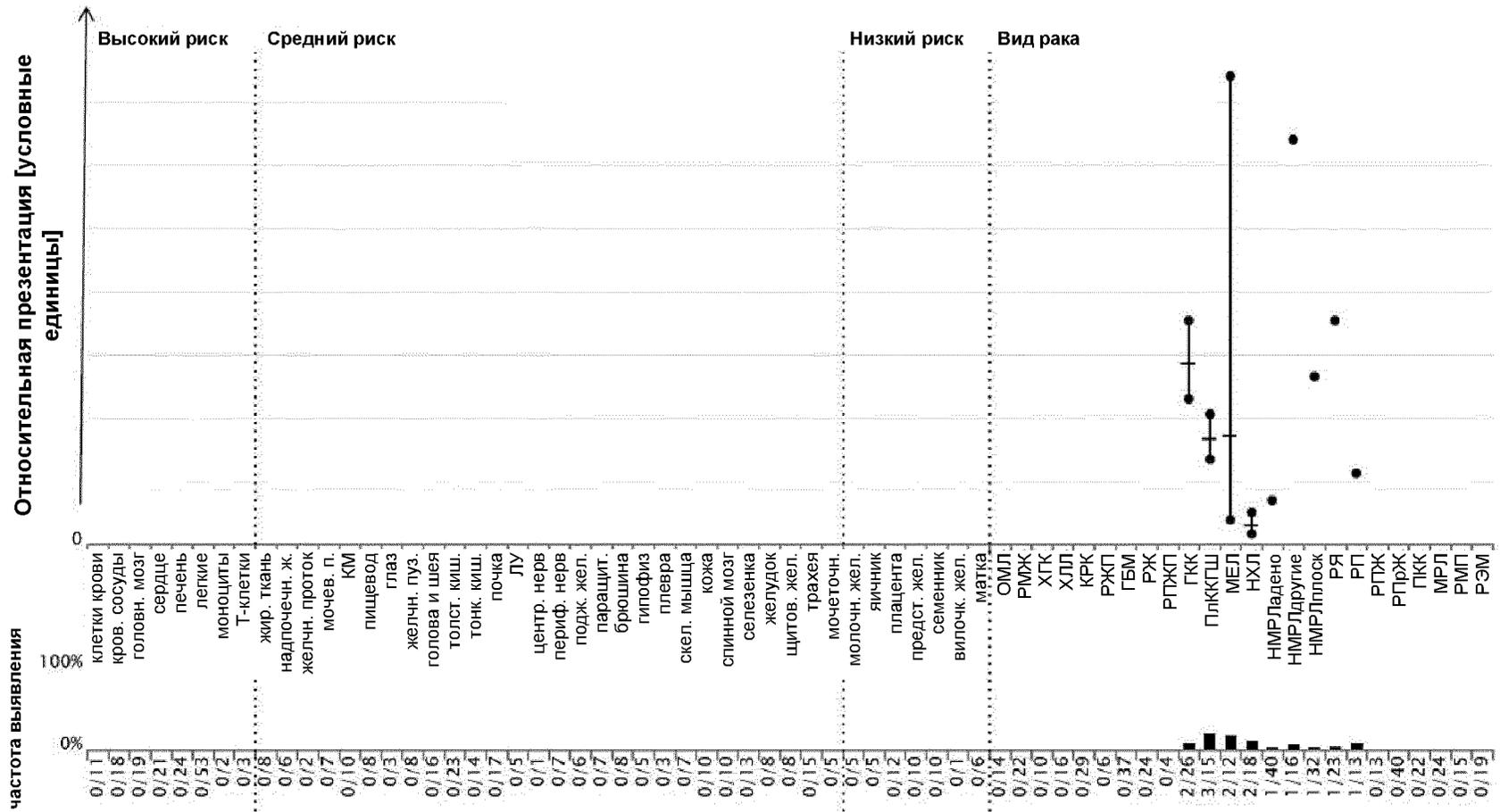
Фигура 1С

Пептид: FLLVPSPIWQL (A*02)
SEQ ID NO: 3



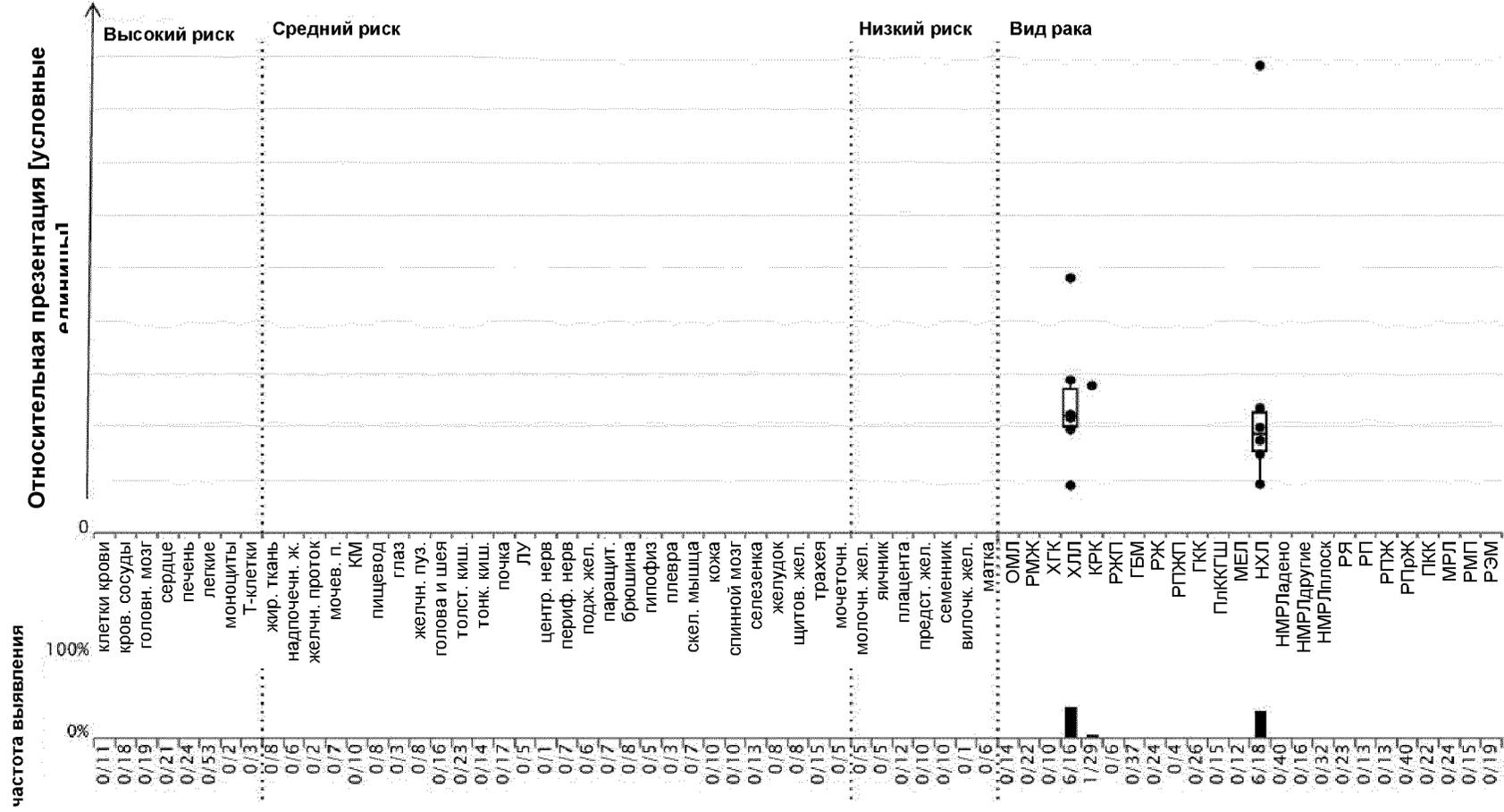
Фигура 1D

Пептид: LVWEVVESV (A*02)
SEQ ID NO: 5



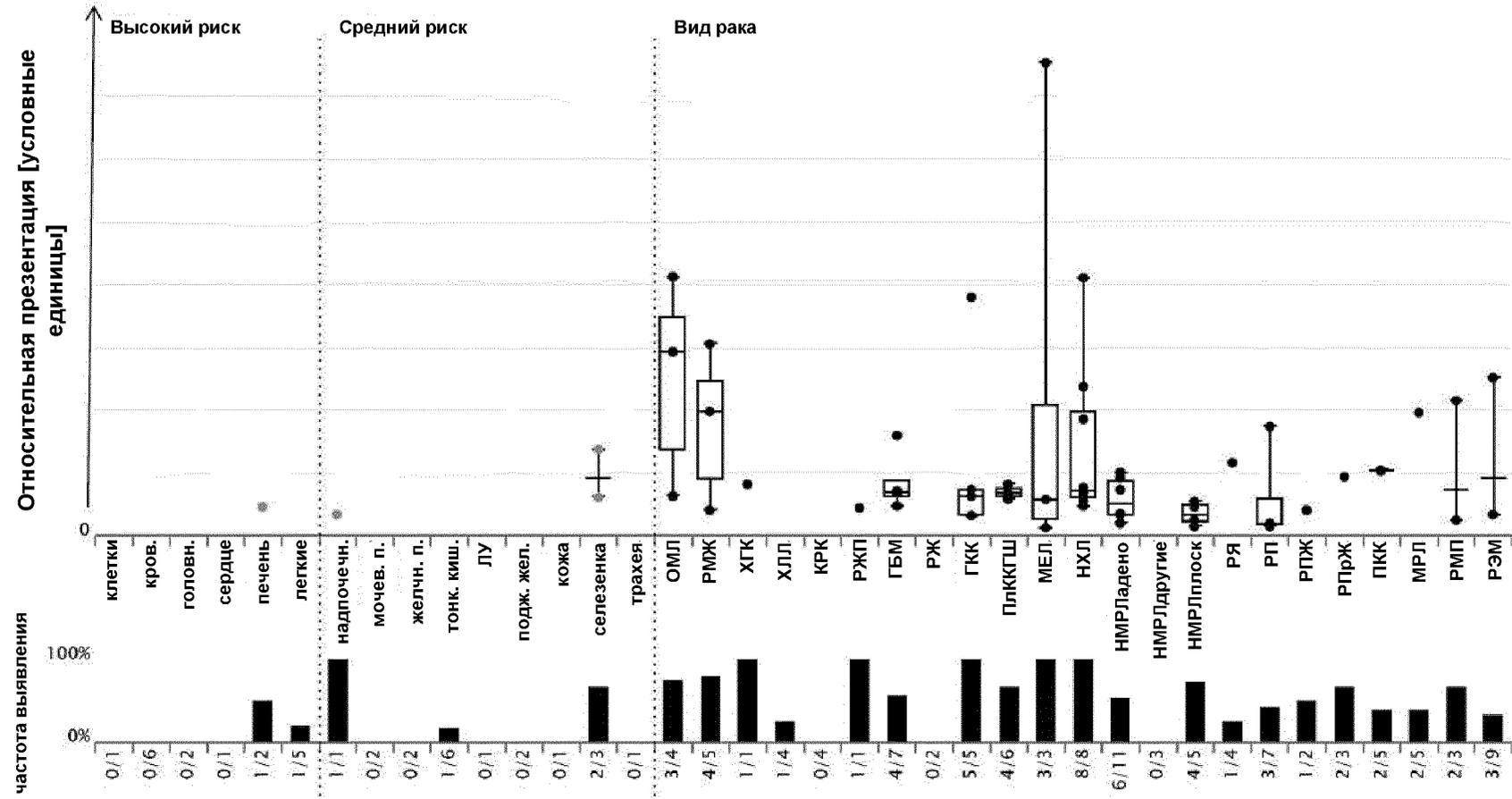
Фигура 1Е

Пептид: SLLDKLSGI (A*02)
SEQ ID NO: 10



Фигура 1F

Пептид: SLLGAATVEPPK (A*03)
SEQ ID NO: 81

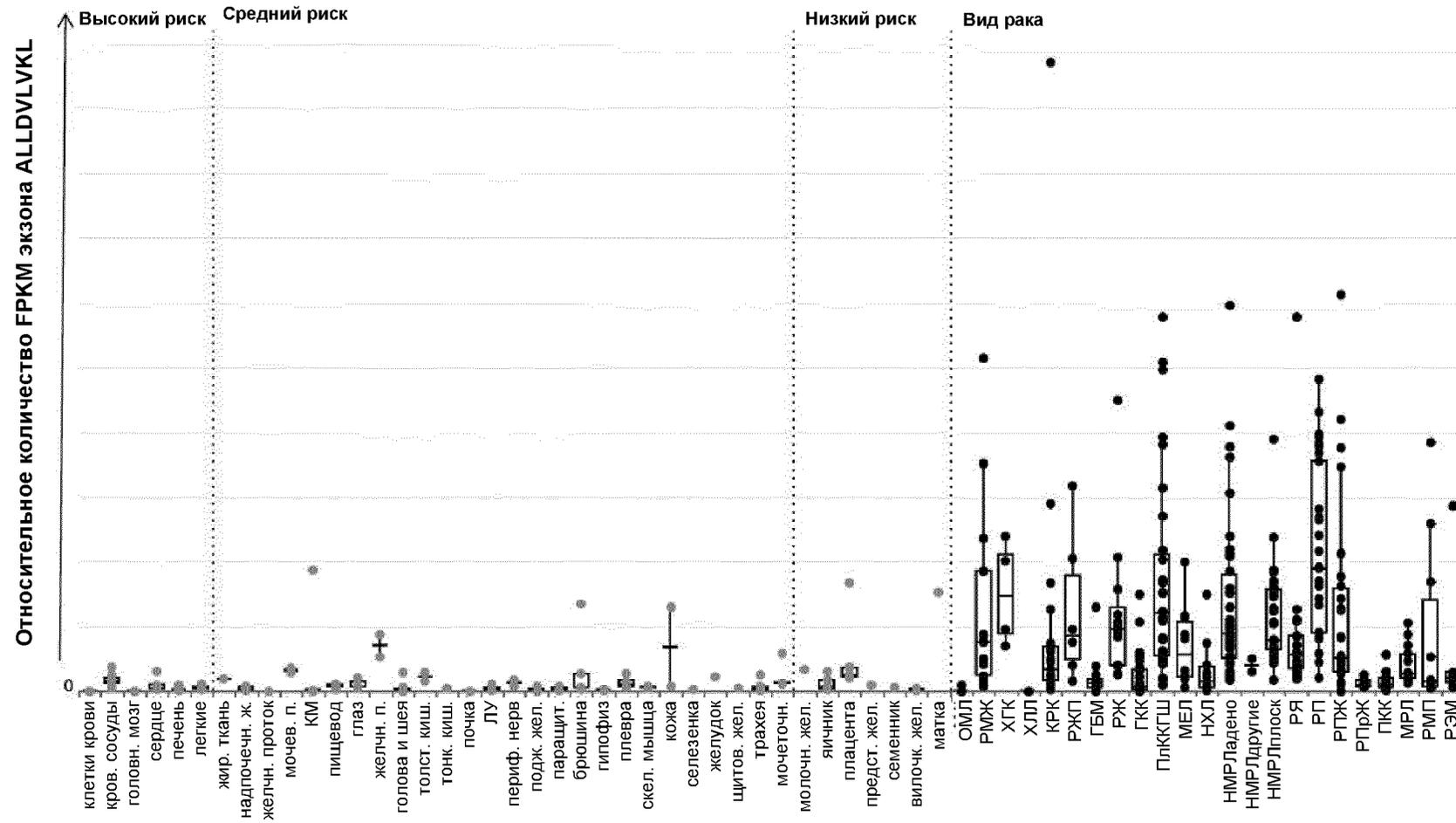


Фигура 2А

Идент. по Ensembl: ENST00000225964

Пептид: ALLDVLVKL

SEQ ID NO: 2

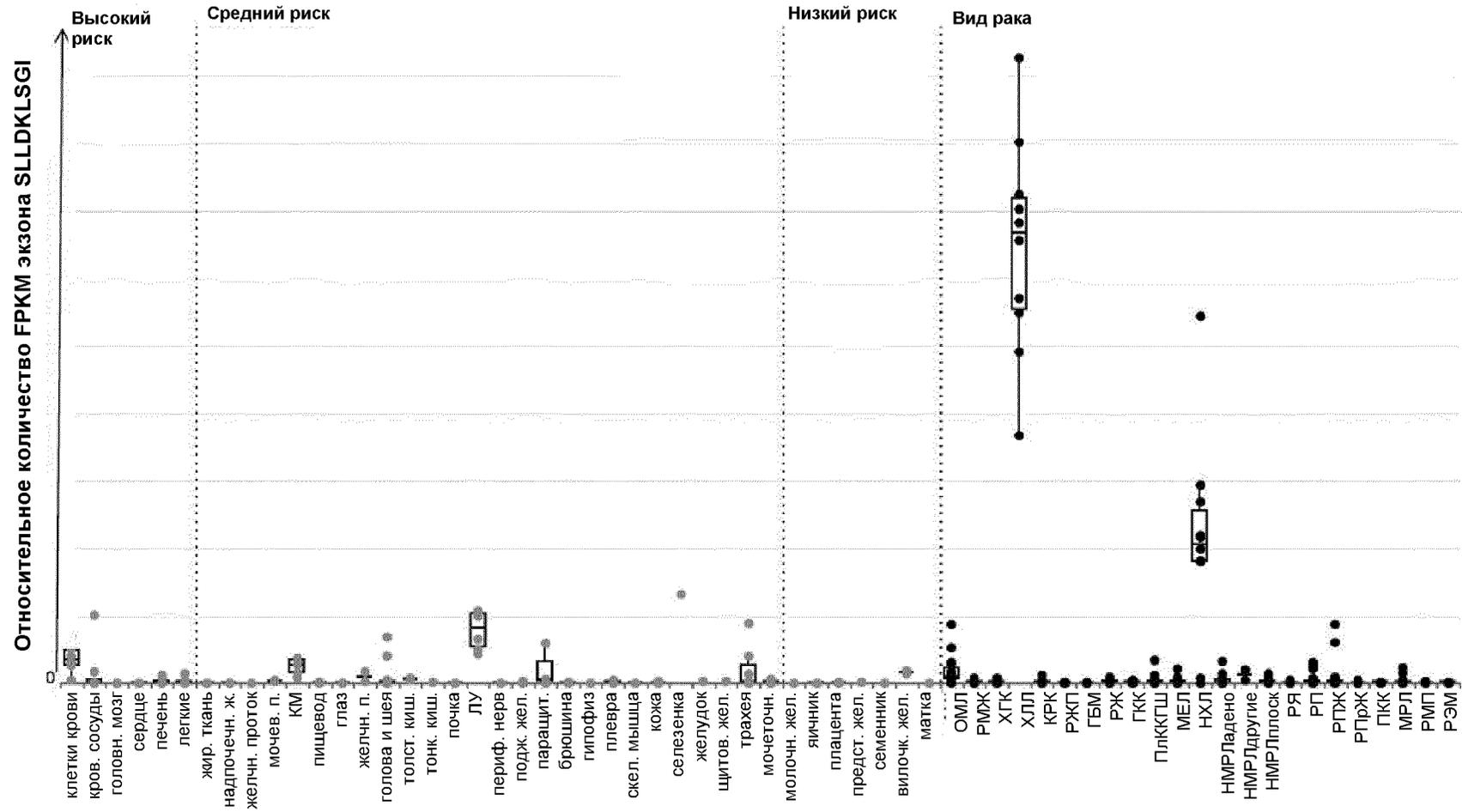


Фигура 2В

Идент. по Ensembl:ENST00000374472

Пептид: SLLDKLSGI

SEQ ID NO: 10

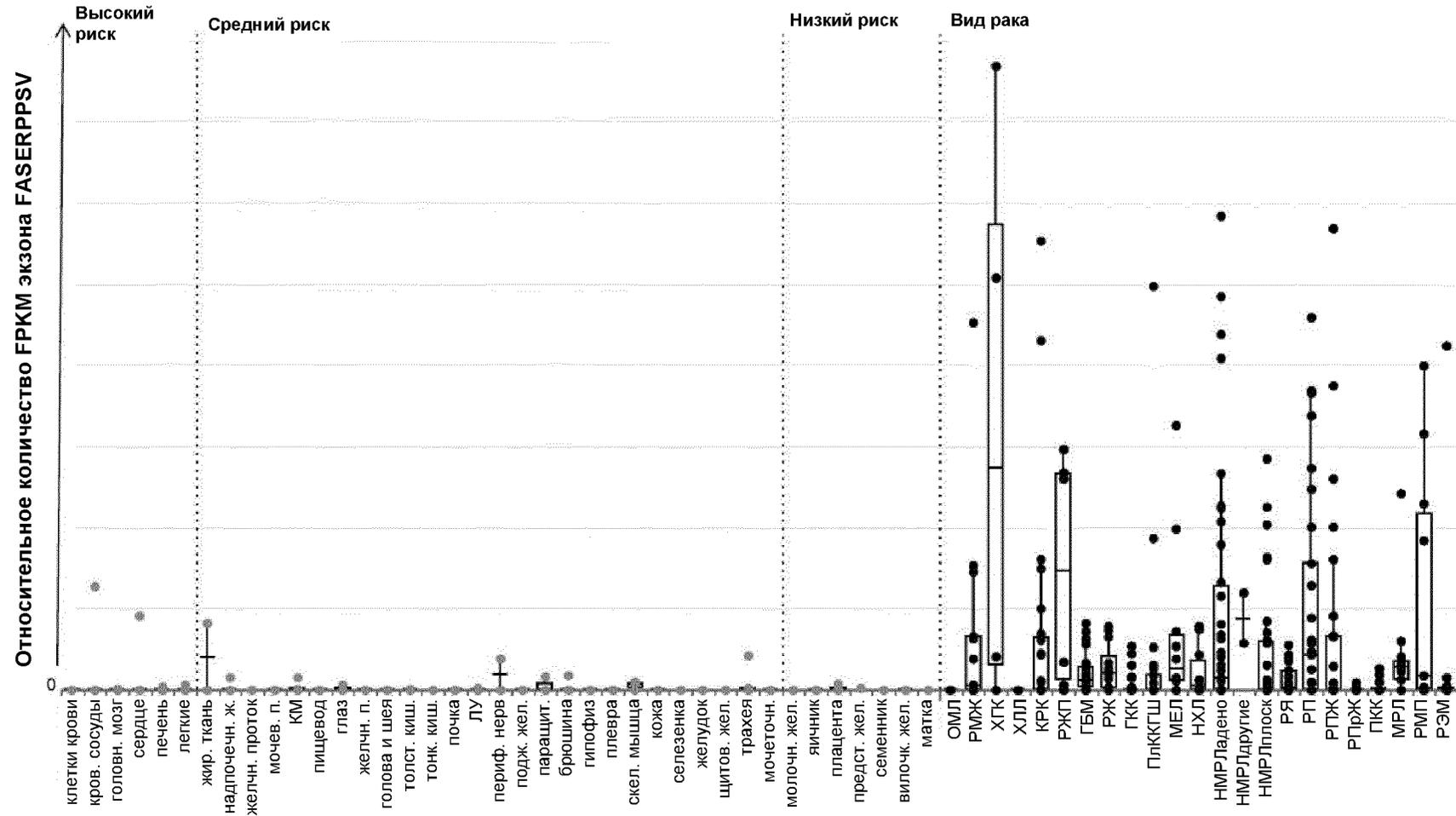


Фигура 2С

Идент. по Ensembl:ENST00000617924

Пептид: FASERPPSV

SEQ ID NO: 33

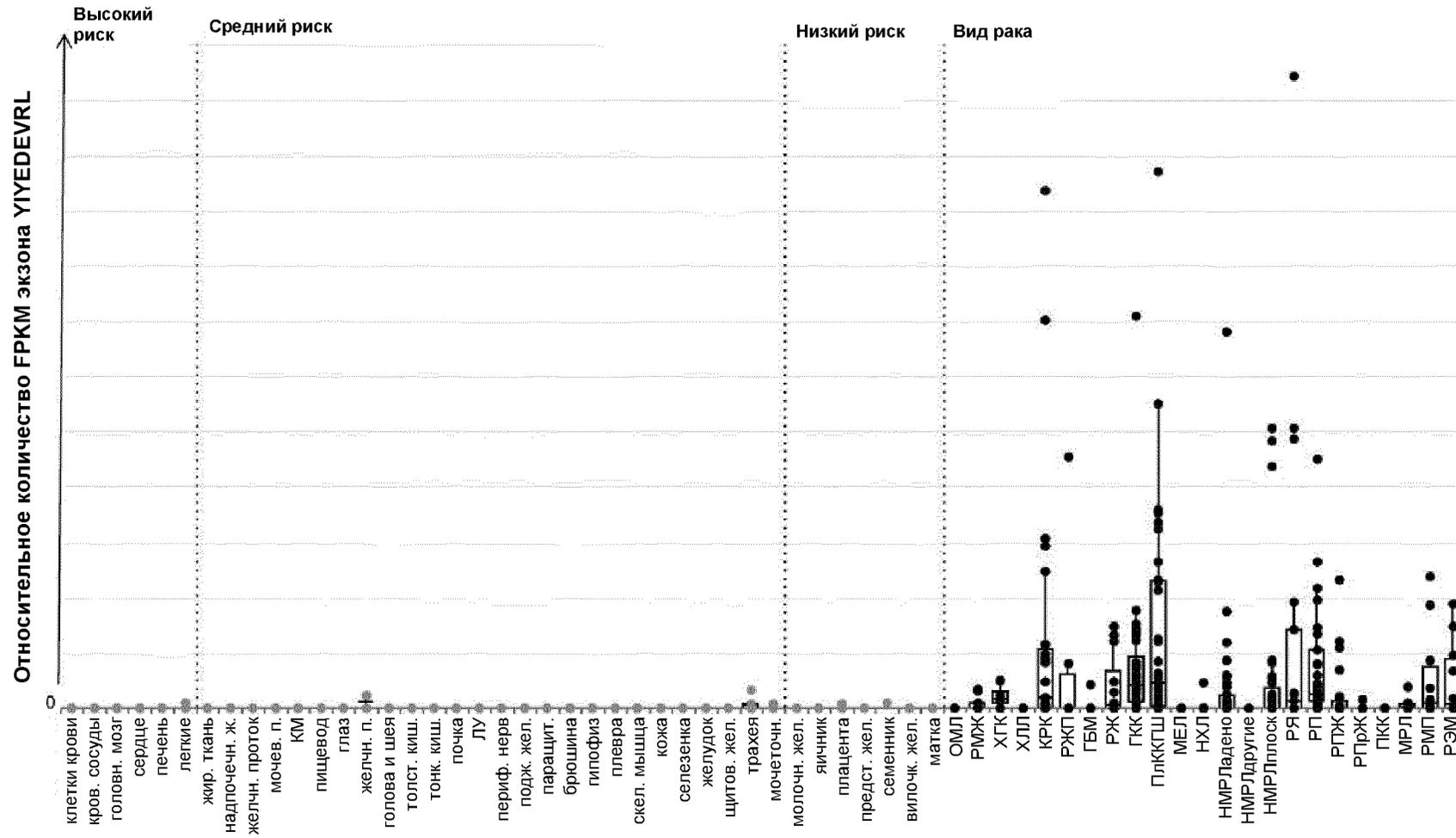


Фигура 2D

Идент. по Ensembl: ENST00000603198

Пептид: YIYEDEVRL

SEQ ID NO: 39

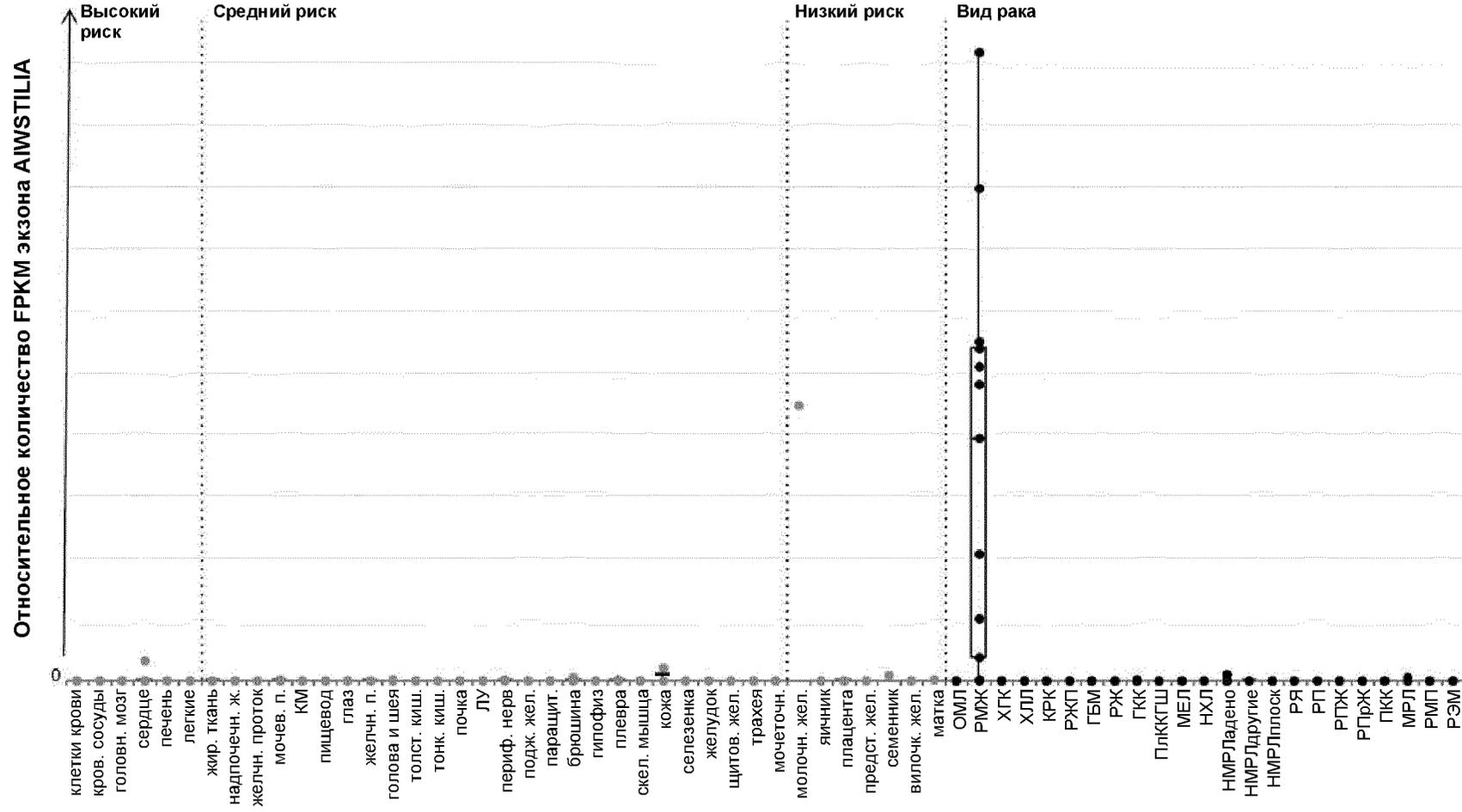


Фигура 2E

Идент. по Ensembl:ENST00000420453

Пептид: AIWSTILIA

SEQ ID NO: 43

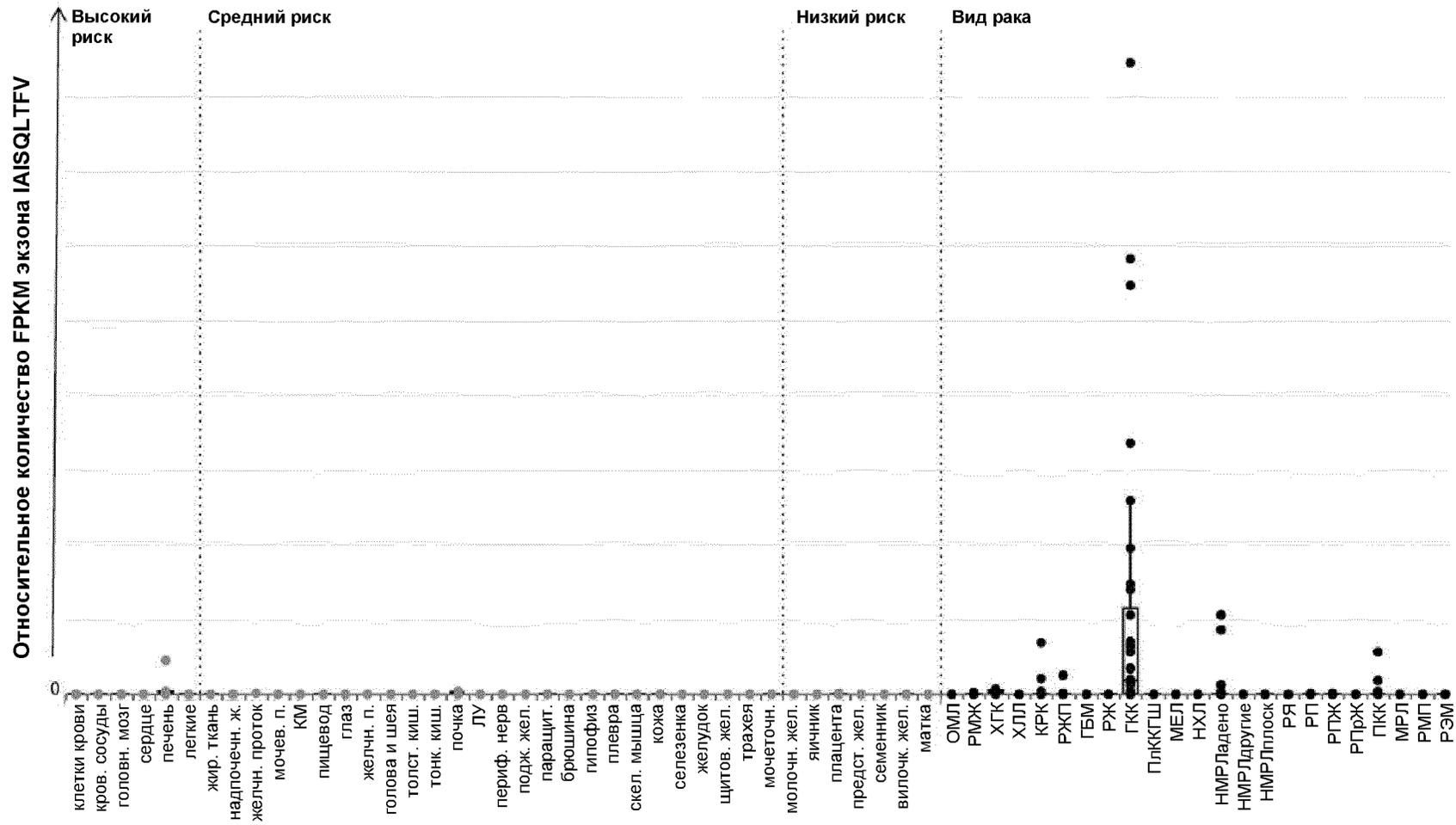


Фигура 2F

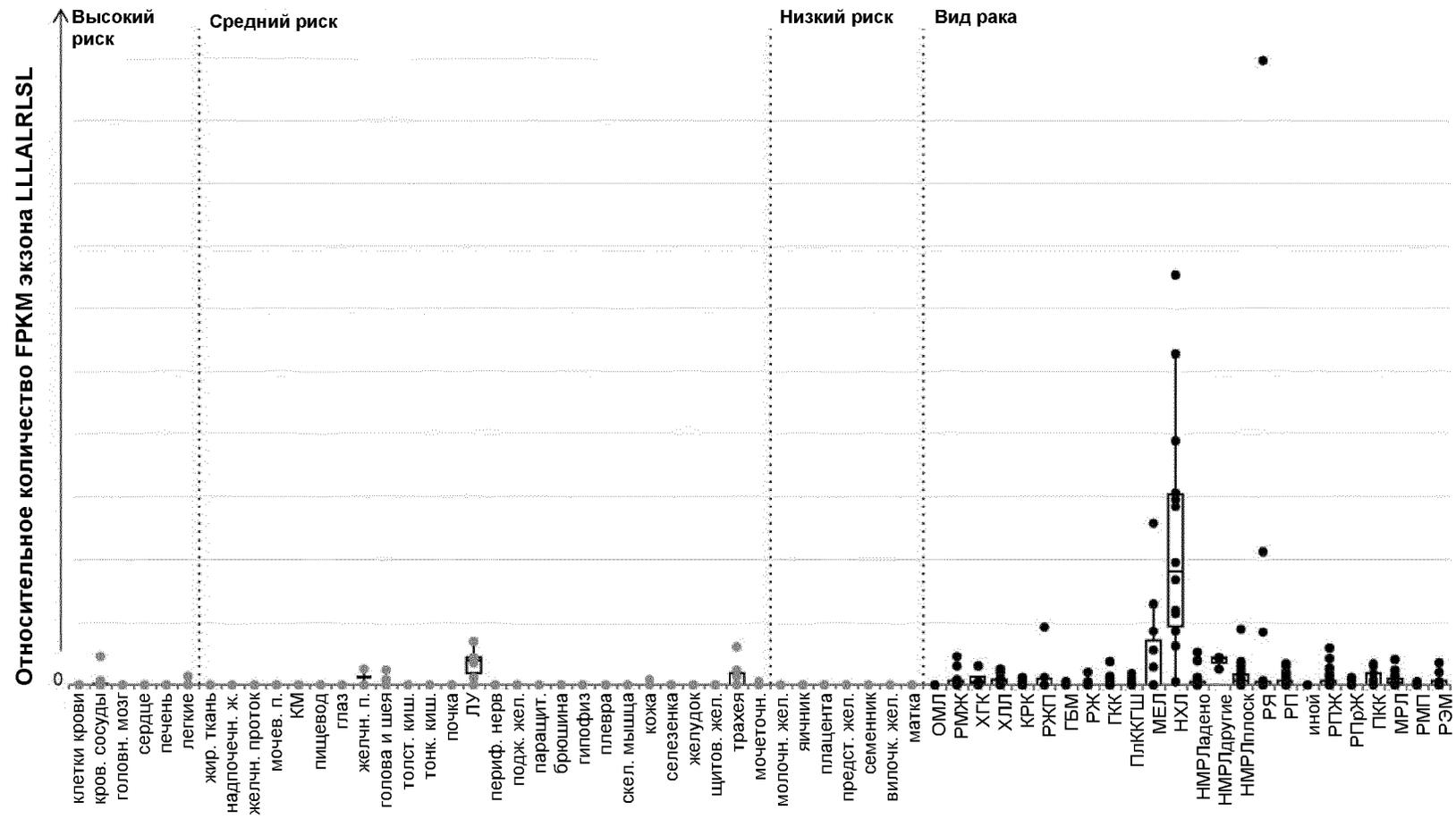
Идент. по Ensembl: ENST00000473984

Пептид: IAISQLTFV

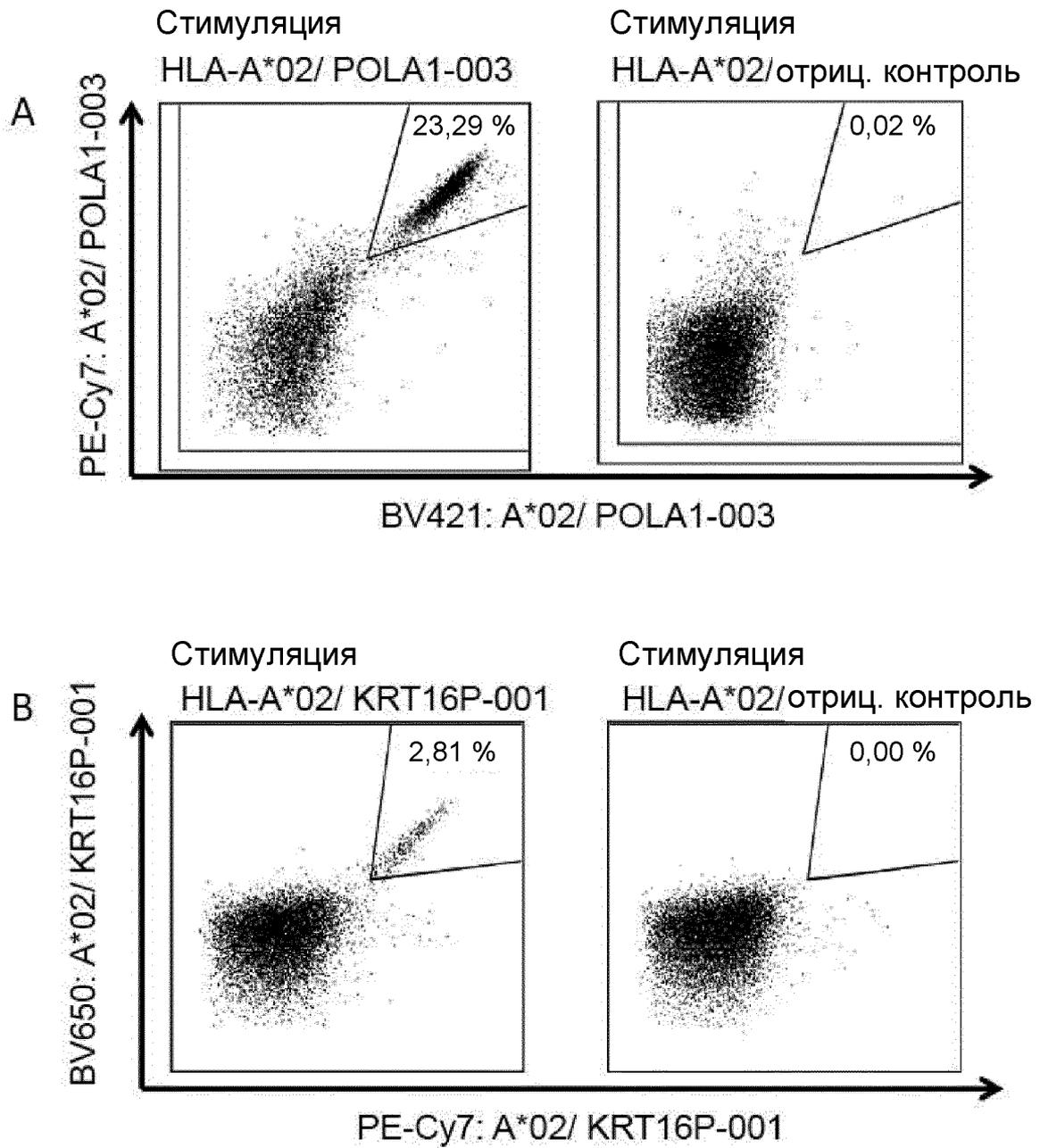
SEQ ID NO: 65



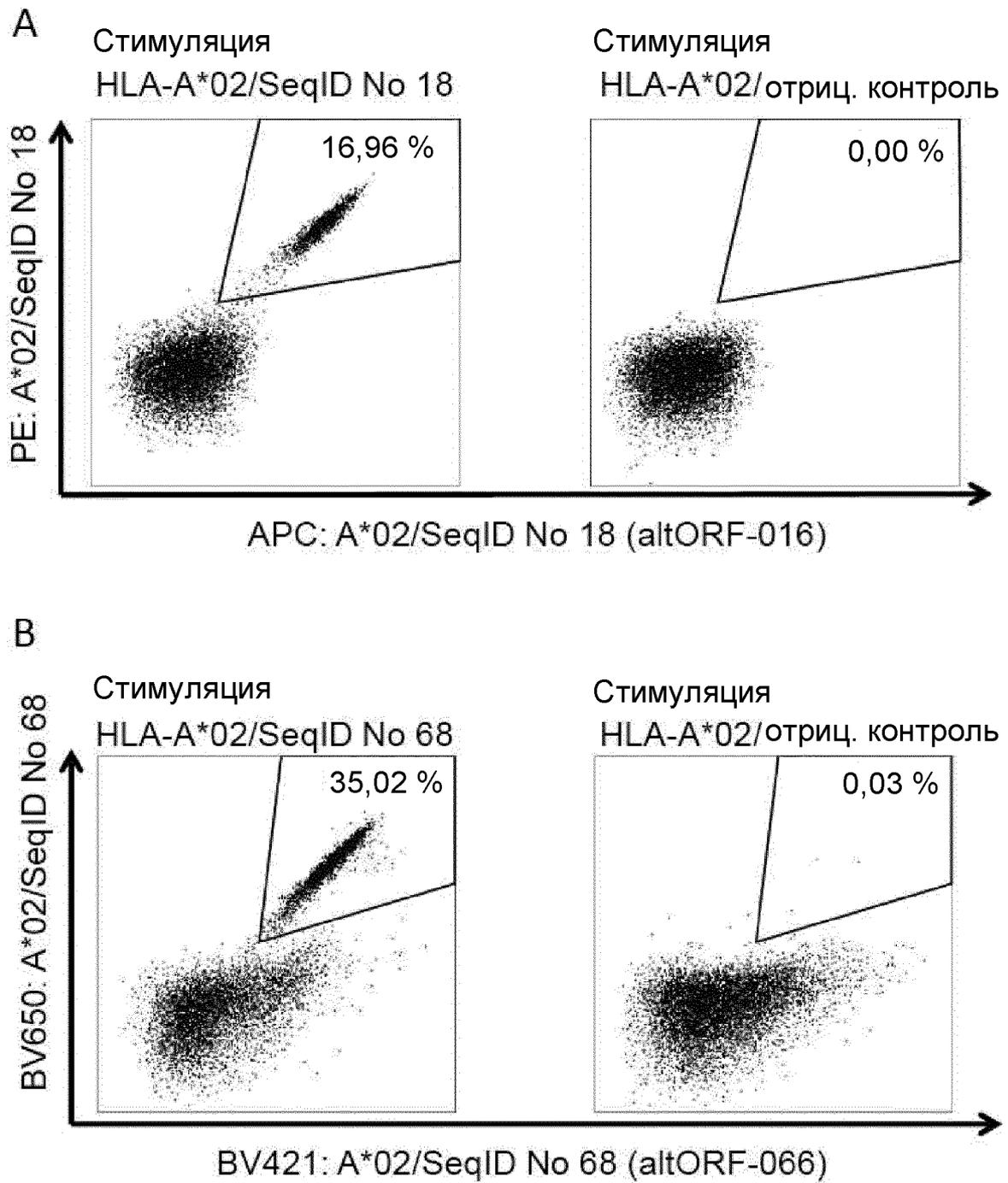
Фигура 2G
 Идент. по Ensembl: ENST00000375105
 Пептид: LLLALRSL
 SEQ ID NO: 64



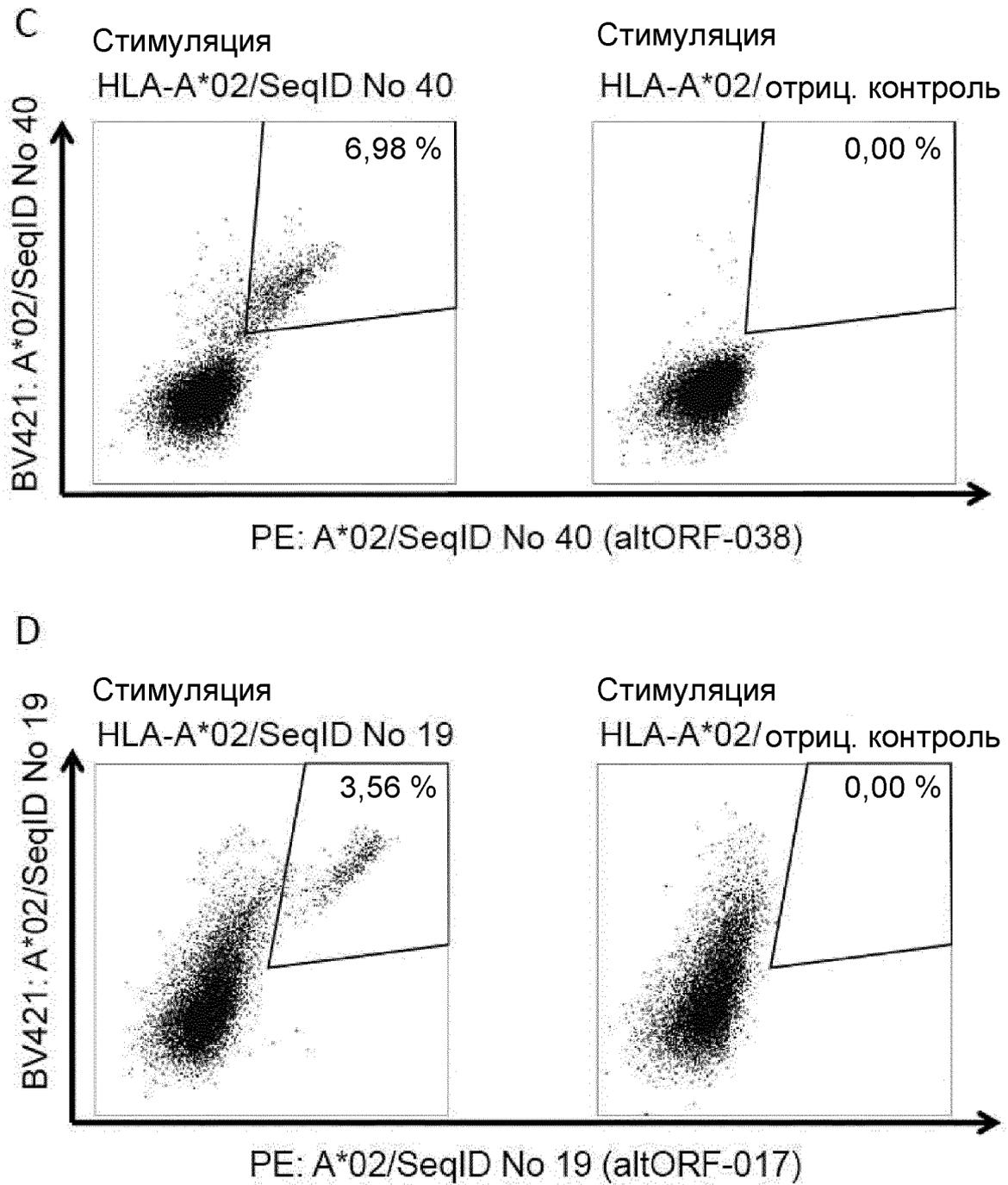
Фигура 3:



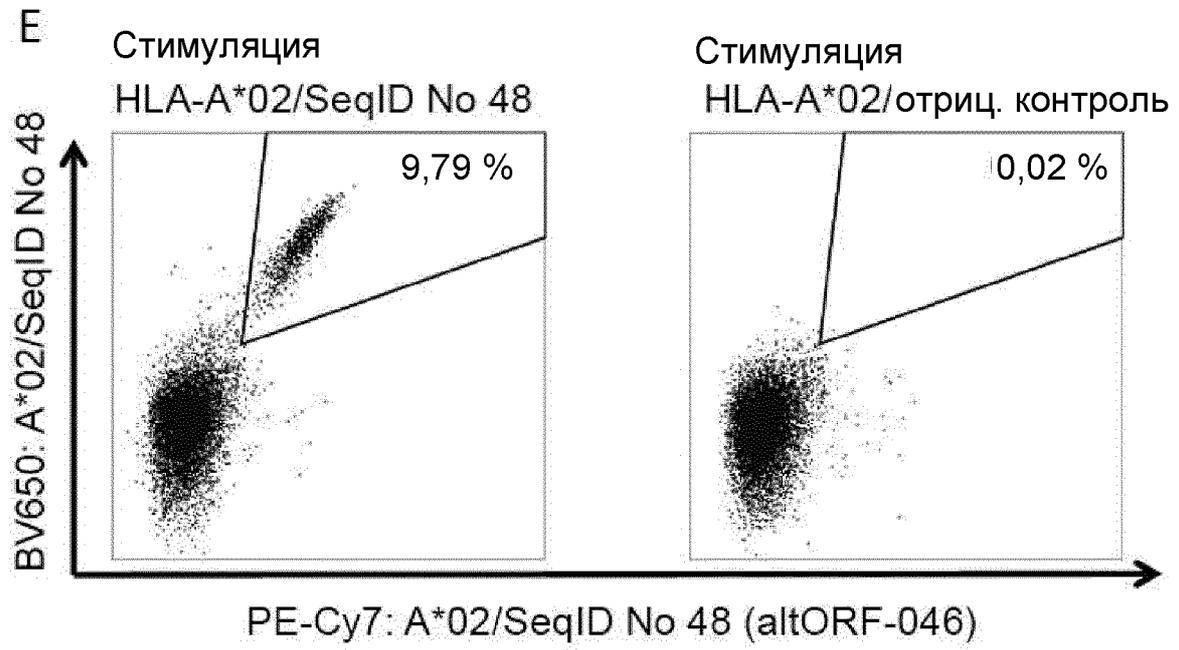
Фигура 4:



Фигура 4 (продолжение)



Фигура 4 (продолжение)



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference I33148WO	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2019/053168	International filing date (<i>day/month/year</i>) 8 February 2019 (08-02-2019)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 21 February 2018 (21-02-2018)
Applicant IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 7 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- the international application in the language in which it was filed
 a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

c. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- the text is approved as submitted by the applicant
 the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- the text is approved as submitted by the applicant
 the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
 as suggested by the applicant
 as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
 as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2019/053168

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. forming part of the international application as filed:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2019/053168

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-23(partially)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2019/053168

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K7/06 A61K38/08 C07K14/47
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2015/018805 A1 (IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH [DE]) 12 February 2015 (2015-02-12) the whole document	1-23
Y	WO 2015/193359 A2 (IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH [DE]) 23 December 2015 (2015-12-23) the whole document	1-23
Y	WO 2017/060169 A1 (IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH [DE]) 13 April 2017 (2017-04-13) the whole document	1-23
	----- -/--	

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search 10 April 2019	Date of mailing of the international search report 02/07/2019
---	---

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Pinheiro Vieira, E
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2019/053168

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>E. MILNER ET AL: "The Effect of Proteasome Inhibition on the Generation of the Human Leukocyte Antigen (HLA) Peptidome", MOLECULAR & CELLULAR PROTEOMICS, vol. 12, no. 7, 28 March 2013 (2013-03-28) , pages 1853-1864, XP055316037, US ISSN: 1535-9476, DOI: 10.1074/mcp.M112.026013 the whole document -----</p>	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2019/053168

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 2015018805	A1	12-02-2015	AU 2014304544 A1	03-12-2015
			AU 2018200389 A1	08-02-2018
			BR 112016000810 A2	12-12-2017
			CA 2912500 A1	12-02-2015
			CA 3020939 A1	12-02-2015
			CL 2016000227 A1	05-08-2016
			CN 105377290 A	02-03-2016
			CN 109748953 A	14-05-2019
			CR 20160018 A	08-06-2016
			CR 20180508 A	27-02-2019
			EA 201690016 A1	31-05-2016
			EP 3030255 A1	15-06-2016
			EP 3456339 A2	20-03-2019
			HK 1222121 A1	23-06-2017
			JP 2016527293 A	08-09-2016
			KR 20160038889 A	07-04-2016
			KR 20180105754 A	28-09-2018
			KR 20180107295 A	01-10-2018
			NZ 714163 A	28-07-2017
			PE 07172016 A1	21-07-2016
			PE 15382018 A1	26-09-2018
			PH 12015502638 A1	07-03-2016
			SG 10201802399W A	27-04-2018
			SG 11201510580U A	26-02-2016
			TW 201506043 A	16-02-2015
			TW 201900669 A	01-01-2019
			US 2016168200 A1	16-06-2016
			US 2017202937 A1	20-07-2017
			US 2017319675 A1	09-11-2017
			WO 2015018805 A1	12-02-2015

WO 2015193359	A2	23-12-2015	CA 2950827 A1	23-12-2015
			EP 3157549 A2	26-04-2017
			JP 2017525336 A	07-09-2017
			TW 201613956 A	16-04-2016
			WO 2015193359 A2	23-12-2015

WO 2017060169	A1	13-04-2017	AU 2016335177 A1	12-04-2018
			CA 3001074 A1	13-04-2017
			CL 2018000780 A1	01-06-2018
			CN 108699119 A	23-10-2018
			CO 2018003659 A2	10-07-2018
			CR 20180191 A	05-07-2018
			EA 201890635 A1	28-09-2018
			EP 3359560 A1	15-08-2018
			JP 2018536383 A	13-12-2018
			KR 20180055826 A	25-05-2018
			MA 42021 A1	28-09-2018
			PE 17992018 A1	19-11-2018
			SG 11201801344S A	27-04-2018
			TW 201718633 A	01-06-2017
			US 2017096461 A1	06-04-2017
			US 2019112347 A1	18-04-2019
			US 2019119342 A1	25-04-2019
			US 2019161526 A1	30-05-2019
			WO 2017060169 A1	13-04-2017

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-23(partially)

A peptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID No. 1, and variant sequences thereof which are at least 88% homologous to SEQ ID No. 1, and wherein said variant binds to molecule(s) of the major histocompatibility complex (MHC) and/or induces T cells cross-reacting with said variant peptide; and a pharmaceutical acceptable salt thereof, wherein said peptide is not a full-length polypeptide.

2-101. claims: 1-23(partially)

A peptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID No. 2 to SEQ ID No. 101, and variant sequences thereof which are at least 88% homologous to SEQ ID No. 2 to SEQ ID No. 101, and wherein said variant binds to molecule(s) of the major histocompatibility complex (MHC) and/or induces T cells cross-reacting with said variant peptide; and a pharmaceutical acceptable salt thereof, wherein said peptide is not a full-length polypeptide.

102. claims: 24-32

A method for producing a personalized anti-cancer vaccine or a compound-based and/or cellular therapy for an individual patient.
