

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037050**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.01.29

(21) Номер заявки
201791950

(22) Дата подачи заявки
2016.03.24

(51) Int. Cl. **A61K 39/00** (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

(54) **НОВЫЕ ПЕПТИДЫ И КОМБИНАЦИИ ПЕПТИДОВ И КАРКАСЫ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ИММУНОТЕРАПИИ ПОЧЕЧНОКЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЫ (ПКК) И ДРУГИХ ВИДОВ РАКА**

(31) **1505585.8; 62/140,767**

(32) **2015.03.31**

(33) **GB; US**

(43) **2018.02.28**

(86) **PCT/EP2016/056601**

(87) **WO 2016/156230 2016.10.06**

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

(72) Изобретатель:
**Мар Андреа, Вайншенк Тони, Шоор
Оливер, Фрицше Дженс (DE), Сингх
Харприт (US), Сонг Колетт (DE)**

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

(56) **WO-A2-2004085461**

KRAMER B.F. ET AL.: "MAGED4-expression in renal cell carcinoma and identification of an HLA-A*25-restricted MHC class I ligand from solid tumor tissue", *CANCER BIOLOGY & THERAPY, LANDES BIOSCIENCE, US*, vol. 4, no. 9, 1 September 2005 (2005-09-01), pages 943-948, XP008115471, ISSN: 1538-4047, abstract, page 944, column 1, paragraph material and methods

TOBIAS KRÜGER ET AL.: "Lessons to be learned from primary renal cell carcinomas: novel tumor antigens and HLA ligands for immunotherapy", *CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY, SPRINGER, BERLIN, DE*, vol. 54, no. 9, 1 September 2005 (2005-09-01), pages 826-836, XP019333162, ISSN: 1432-0851, DOI: 10.1007/S00262-004-0650-5, the whole document

WO-A2-2009015842

EP-A1-1760089

WO-A2-2004048599

WO-A1-9814466

US-A1-2005106644

WO-A2-2007114954

US-A1-2010029573

WEINSCHENK T. ET AL.: "Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines", *CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US*, vol. 62, no. 20, 15 October 2002 (2002-10-15), pages 5818-5827, XP002266492, ISSN: 0008-5472, the whole document

(57) Изобретение относится к пептидам, белкам, нуклеиновым кислотам и клеткам для применения в иммунотерапевтических методах. В частности, изобретение относится к иммунотерапии рака. 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.

B1**037050****037050****B1**

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

Рак почек более распространен среди мужчин, чем среди женщин, и в 2012 году занимал 9-е место в мире среди наиболее распространенных раковых заболеваний у мужчин (214000 случаев) и 14-е место у женщин (124000 случаев). 70% новых случаев заболевания было выявлено в странах с высоким и очень высоким уровнем развития, при этом, по приблизительным оценкам, 34% новых случаев приходится на Европу и 19% - на Северную Америку. Число смертей от рака почек в 2012 году, по приблизительным оценкам, составило 143000 (91000 у мужчин, 52000 у женщин); рак почек занимает 16-е место среди наиболее частых причин летального исхода от рака в мире.

Самая высокая частота заболеваемости была обнаружена в Чехии. Повышенный уровень был также обнаружен в северной и Восточной Европе, Северной Америке и Австралии. Низкий уровень заболеваемости наблюдается в большинстве стран Африки и Восточной Азии. Частота смертельных исходов ниже в высокоразвитых странах (соотношение общей смертности к частоте возникновения составляет 0,4), чем в странах с низким или средним уровнем развития (0,5). Лишь 3,1% случаев был диагностирован в Африке, но 5,7% смертей были зарегистрированы в этом регионе. Частота возникновения и уровень смертности растут во многих странах с разным уровнем развития человеческого потенциала (World Cancer Report, 2014).

Большинство раковых заболеваний почек - это почечноклеточные карциномы (ПКК), гетерогенный класс опухолей, возникающих из различных видов клеток в паренхиме почек. Большинство является почечноклеточными карциномами светлоклеточного типа (около 70% случаев заболевания раком почек), за ними следуют папиллярная (10-15%), хромофобная (около 5%) почечноклеточные карциномы и карциномы собирающего протока (<1%). Каждый из этих подтипов почечноклеточных опухолей имеет различные генетические характеристики (Moch, 2013; World Health Organization Classification of Tumours, 2004).

Почечноклеточная карцинома (ПКК) характеризуется отсутствием ранних предупредительных признаков, различными клиническими проявлениями и резистентностью к лучевой терапии и химиотерапии. В целом, при первом обследовании у 25-30% пациентов с ПКК имеются метастазы (Hofmann et al., 2005). В течение времени у трети пациентов с ПКК развивается метастатическая болезнь. Таким образом, у приблизительно 50-60% всех пациентов с ПКК, в конечном итоге, появляется метастатическая болезнь (Bleumer et al., 2003; Hofmann et al., 2005). Среди тех, у кого имеются метастазы, приблизительно у 75% встречаются метастазы в легких, у 36% поражены лимфатические узлы и/или мягкие ткани, у 20% - кости и у 18% - печень (Sachdeva et al., 2010).

Пациенты с ПКК, у которых имеются метастазы и получающие системную терапию первой линии с использованием цитокинов, могут быть распределены в группы риска по выживаемости на основе пяти прогностических факторов (Motzer et al., 2004). Наблюдавшимися до лечения характеристиками, ассоциированными с более короткой выживаемостью, были низкий показатель общего статуса по шкале Карновского (<80%), высокий уровень лактатдегидрогеназы в сыворотке крови (>1,5 верхней границы нормы), низкий уровень гемоглобина (<нижней границы нормы), высокий уровень скорректированного кальция сыворотки крови (>10 мг/дл) и время с момента постановки диагноза до начала лечения <1 года. На основании данных факторов риска пациенты были распределены в три группы. Медианное значение времени до смерти у 18% пациентов с фактором риска ноль (благоприятная группа риска) составило 30 месяцев. 62% пациентов имели один или два фактора риска (промежуточная группа риска), и медианный показатель времени выживаемости в этой группе составил 14 месяцев. У пациентов с тремя или более факторами риска (неблагоприятная группа риска), куда входило 20% пациентов, медианный показатель времени выживаемости составил 5 месяцев. Применение категоризации с распределением в группы риска согласно MSKCC (Мемориального онкологического центра им. Слоуна-Кеттеринга) широко использовалось в клинических исследованиях для распространенной ПКК. Распределение на категории риска может применяться для планирования и интерпретации результатов клинических исследований и выбора направления терапии.

Факторами риска для ПКК являются табакокурение и ожирение. Различные мета-анализы подтвердили, что табакокурение в любой период жизни повышает риск возникновения рака почек по сравнению с никогда не курившими пациентами (Cho et al., 2011; Hunt et al., 2005). Также имеется дозозависимое увеличение риска относительно количества сигарет, выкуренных в день. Риск снижается в течение 5 лет после отказа от курения. Избыточный вес, в особенности ожирение, является фактором риска заболеть раком почек как для женщин, так и для мужчин (Ljungberg et al., 2011). Доля всех случаев рака почек, связанных с избыточным весом и ожирением, по оценкам составляет около 40% в США и вплоть до 40% в Европейских странах (Renehan et al., 2008; Renehan et al., 2010). Механизмы, с помощью которых ожирение влияет на канцерогенез рака почки, неясны. Половые стероидные гормоны могут оказывать влияние на пролиферацию клеток почек за счет непосредственного воздействия, опосредованного эндокринным рецептором. Ожирение в комбинации с эндокринными нарушениями, такими как пониженный уровень глобулина и прогестерона, связывающих половые гормоны, резистентность к инсулину и повышенные уровни факторов роста, таких как инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1), может способствовать развитию рака почек. Недавно в исследовании методом случай-контроль сообщалось о тесной взаимосвязи светлоклеточной карциномы с ожирением (World Cancer Report, 2014).

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

Эверолимус и акситиниб рекомендуются в качестве терапии второй линии для пациентов, которые не получили пользы от терапии ингибиторами рецепторной тирозинкиназы (ИТК), мишенью которой является VEGF, в соответствии с установленными руководствами.

Известная иммуногенность ПКК обуславливает применение иммунотерапии и противораковых вакцин при распространенной ПКК.

Интересная корреляция между экспрессией лимфоцитов PD-1 и распространенной ПКК, степенью злокачественности и прогнозом течения, а также селективной экспрессией PD-L1 опухолевыми клетками ПКК и ее потенциальной ассоциацией с худшими клиническими исходами привела к разработке новых средств на основе антител к PD-1/PD-L1 в отдельности или в комбинации с антиангиогенными лекарственными средствами или другими иммунотерапевтическими подходами для лечения ПКК (Massari et al., 2015).

Для ПКК поздних стадий в рамках клинического исследования противораковой вакцины III фазы TRIST проводится оценка того, продлевается ли выживаемость пациентов с ПКК локально-распространенной или метастатической стадии при лечении TroVax (вакциной с применением опухолеассоциированного антигена, 5T4, с поксвирусным вектором) в дополнение к стандартной терапии первой линии. Медиана выживаемости не была достигнута ни в одной из групп с 399 пациентами (54%), продолжающих исследование, тем не менее анализ данных подтверждает полученные ранее клинические результаты, демонстрируя, что вакцина TroVax является иммунологически активной и что существует корреляция между интенсивностью ответа на 5T4-специфические антитела и улучшением выживаемости. Далее проводятся несколько исследований пептидных вакцин с применением эпитопов, избыточно экспрессируемых клетками ПКК.

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

В последние годы было определено и охарактеризовано несколько ТАА, экспрессируемых клетками ПКК и распознаваемых антигенспецифическими ЦТЛ, с помощью метода экспрессионного клонирования, подхода "обратной иммунологии" или с применением технологии микрочипов ДНК (Dannenmann et al., 2013; Michael and Pandha, 2003; Minami et al., 2014; Renkvist et al., 2001; Wierecky et al., 2006).

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 рака ПКК в частности. Также существует необходимость идентифицировать факторы,

представляющие собой биомаркеры рака в целом и ПКК 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/neu, сурвивин, теломераза или WT1.

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

д) ТАА, образующиеся в результате аномальных посттрансляционных 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 посттрансляционных 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 дегградации, которые могут быть опухолеспецифическими или могут не быть ими.

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

Мишенями иммунотерапии, основанной на Т-клетках, являются пептидные эпитопы, полученные из опухолеассоциированных или опухолеспецифических белков, которые презентруются молекулами главного комплекса гистосовместимости человека (МНС). Антигены, которые распознаются опухолеспецифическими Т-лимфоцитами, т.е. 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 форма 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 эпителиев, 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., 2014a).

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 et al. удалось идентифицировать ряд эпитопов МНС II класса непосредственно из опухолей (WO 2007/028574, EP 1760088 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). Опухольеспецифические 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 *in vitro* или *in vivo* к Т-клеточному ответу.

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

Поэтому 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: 114, 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: 114, 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: 114, 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: 114, 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. Все пептиды табл. 1 и 2 связываются с HLA-A*02. Пептиды из табл. 2 были раскрыты ранее в виде обширных списков в качестве результатов скринингов с высокой пропускной способностью с высокой долей ошибок или были вычислены с помощью алгоритмов, однако ранее ни в коей мере не были ассоциированы с раковыми заболеваниями. Пептиды из табл. 3 являются дополнительными пептидами, которые могут быть полезны в комбинации с другими пептидами по изобретению. Пептиды табл. 4А и 4В полез-

ны также для диагностики и/или лечения различных других злокачественных заболеваний, которые включают избыточную экспрессию или избыточную презентацию соответствующего базового полипептида.

Таблица 1

Пептиды в соответствии с настоящим изобретением

SEQ ID No	Последовательность	Ид. № гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
1	ALIVSLPYL	10786	SLC17A3
2	ILWREVVTL	3299	HSF4
3	RLLGEVQAL	3299	HSF4
4	FLSQDIITV	5972	REN
5	YLYPNLTRL	6540	SLC6A13
6	VLFEISKTV	23250	ATP11A
7	FLLSLIDRL	112399	EGLN3
8	GLASFKSFL	8490	RGS5
9	ILLQKPDSV	8490	RGS5
10	KLLQNNYGL	8490	RGS5
11	FIQTEAPKEV	8490	RGS5
12	ALDPGSQLI	54437	SEMA5B
13	KIMAQILTV	120892	LRRK2
14	ALLTETIFL	120892	LRRK2
15	ILIKHLVKV	143872	ARHGAP42
16	FMPEELPQL	55258	THNSL2
17	ILAQQVHAL	113220	KIF12
18	YVLDLAAKV	47	ACLY
19	LLDPGSLQL	646658	SYNDIG1L
20	AVANTTFTV	80270	HSD3B7
21	RLIQGDQILSV	10207	INADL
22	FLSPPLPSV	593, 641649	BCKDHA, TMEM91
23	YIQEVVQYI	23236	PLCB1
24	FTLGTTVFL	4717	NDUFC1
25	LLVPAHLVAA	11082	ESM1
26	SLMEILYTL	91949	COG7
27	SLSDLLVSL	23596	OPN3
28	FIADLVVGL	2023, 2026, 2027	ENO1, ENO2, ENO3
29	ILLDLEQAL	9820	CUL7
30	QLFYTKIFL	5351	PLOD1
31	VLFGLDPAVIKV	259217	HSPA12A
32	FLAGGIRGSGA	113730	KLHDC7B

037050

33	FIADVVEKI	5654, 94031	HTRA1, HTRA3
34	ELNNQNFYL	11113	CIT
35	VLHSLQTQL	51129	ANGPTL4
36	SLFGKKYIL	2274	FHL2
37	VLAPVILML	8714	ABCC3
38	VLLDTILQL	11077	HSF2BP
39	YLLNLNHLGL	23471	TRAM1
40	YIQEHLQI	10625	IVNS1ABP
41	GLLKTQLKL	25932	CLIC4
42	VILDTGTIQL	9027	NAT8
43	YLKDELDEL	23255	SOGA2
44	ALFSFVTAL	80727	TTYH3
45	ALLGIPLTL	3777, 60598	KCNK3, KCNK15
46	GLSEVLVQI	57553	MICAL3
47	TLAEVRVQEI	56950	SMYD2
48	VVASNIMEV	5209	PFKFB3
49	VLIVEVPGV	111	ADCY5
50	SLSDHIVLL	3675	ITGA3
51	NLWPMILTL	3675	ITGA3
52	SILDAVQRV	137902	PXDNL
53	FLLEIRQTL	23161	SNX13
54	ALVAKGLVQA	10327	AKR1A1
55	YLALILPVL	9122	SLC16A4
56	ILMDFSNSM	3691	ITGB4
57	SLQKEILYL	55102	ATG2B
58	FLVDFEQSHL	1573	CYP2J2
59	SLKNNVSV	7045	TGFBI
60	ILWKDIEYV	143425	SYT9
61	SLMGILLRI	22900	CARD8

037050

62	VLGPAFLVQL	55244	SLC47A1
63	GLIEDHFDVTV	51752	ERAP1
64	LLAASVALA	4885	NPTX2
65	IYGGSVTGA	7167, 729708	TPI1, TPI1P1
66	TLLKTIKIV	57545	CC2D2A
67	LLDVLAPLV	80781	COL18A1
68	YVLTQPPSV	28796, 28815, 28831, 3537, 3538	IGLV3-21, IGLV2-14, IGLJ3, IGLC1, IGLC2
69	ILADLLPSL	25979	DHRS7B
70	SLTALRLLL	9920	KBTBD11
71	ALDGHLYAV	9920	KBTBD11
72	YSLEKVFGI	10916	MAGED2
73	GLDGIPFTV	7205	TRIP6
74	GLFHKQVTV	23037	PDZD2
75	FLIKSINLV	143879	KBTBD3
76	VLADDHLIEV	100034743, 5174, 728939	PDZK1P2, PDZK1, PDZK1P1
77	SLIKHKIML	523	ATP6V1A
78	ALLDTVQQA	8911, 8912	CACNA1I, CACNA1H
79	ALADIVWRA	84182	FAM188B
80	KLASMLETL	112464	PRKCDBP
81	SLLPALPKL	4036	LRP2
82	SLLQATDFMSL	7070	THY1
83	IQWSIVPEV	23151	GRAMD4
84	YLMDEGAHL	7358	UGDH
85	FVMSEIRTV	114991	ZNF618
86	GLLQGKLALL	4835	NQO2
87	LADGVQKV	8542	APOL1
88	TLAELHISL	84166	NLRC5
89	SLLAVTEV	3714	JAG2
90	FTLEKNFVI	1292	COL6A2
91	MLLSSLVSL	79001	VKORC1
92	FLFRDILEL	29102	DROSHA

Таблица 2

Дополнительные пептиды в соответствии с настоящим изобретением,
ассоциация которых с раком не была известна ранее

SEQ ID No	Последовательность	Ид. № гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
93	GVMAGDIYSV	123	PLIN2
94	ILHHKVYDL	1528	CYB5A
95	KLTDVGIATL	115701	ALPK2
96	TLAETLVNL	283372, 283373	ANKRD52
97	TLISELVQA	9820	CUL7
98	KIPPVSPSI	57561	ARRDC3
99	GLAPHLEQI	79711	IPO4
100	KLNVAPLAV	653784, 80097	MZT2A, MZT2B
101	HIYDKAFITV	2321	FLT1
102	LLFDVHTTL	65250	C5orf42
103	KLQDGLLHI	7076	TIMP1
104	ALFEGVVRQI	6236	RRAD
105	ALADLDELLIRA	3339	HSPG2
106	VLMDLKALL	51428	DDX41
107	VLMDLKALLL	51428	DDX41
108	VLISVLQAI	26999	CYFIP2
109	YLWSRVEKL	120892	LRRK2
110	LLDLHSYLL	10299	MARCH6
111	TLLETEMLL	80817	CEP44
112	LLFDHLEPIEL	25780	RASGRP3
113	SLFDWNVKL	134111	UBE2QL1
114	ALAVNISAA	908	CCT6A

Таблица 3

Пептиды, полезные, например, для персонализированной
противораковой терапии

SEQ ID No	Последовательность	Ид. № гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
115	LLDPKTIFL	26762	HAVCR1
116	GLVDIMVHL	8701	DNAH11
117	VLFGELPAL	8701	DNAH11
118	FLNAIETAL	8701	DNAH11
119	RLHDENILL	23322	RPGRIP1L
120	GLAGDNIYL	6582	SLC22A2
121	ALLRTVVSV	2590	GALNT2
122	SLDPSPQV	9514	GAL3ST1
123	YVDPVITSI	4233	MET
124	ILSPLSVAL	5345	SERPINF2
125	KLDPTKTTL	10397	NDRG1
126	KIQEILTQV	10643	IGF2BP3
127	VLAPLFVYL	2535, 8321, 8324	FZD2, FZD1, FZD7
128	YLEEDVYQL	23255	SOGA2
129	VLAPRVLRA	5954	RCN1
130	ALPTVLVGV	5351	PLOD1
131	VMAGDIYSV	123	PLIN2
132	SVASTITGV	123	PLIN2
133	QLIDYERQL	11072	DUSP14
134	VADKIHSV	11072	DUSP14

135	VVDEGPTGV	9123	SLC16A3
136	YQDPHSTAV	1956	EGFR
137	TLVAIVGV	60681	FKBP10
138	SLDTLMTYV	22829	NLGN4Y
139	ILNVDGLIGV	47	ACLY
140	SLANNVTSV	131566	DCBLD2
141	LLVDDSFLHTV	253982	ASPHD1
142	SVDVSPPKV	113146	AHNAK2
143	ALFVRLALA	7045	TGFBI
144	RLLDVLAPLV	80781	COL18A1
145	SLHFLILYV	487, 488	ATP2A1, ATP2A2
146	KLIDLSQVMYL	346389	MACC1
147	ALADKELLPSV	84883	AIFM2
148	KLLTEVHAA	101	ADAM8
149	SILTIEDGIFEV	100287551, 3306, 3312	HSPA8P8, HSPA2, HSPA8
150	TLMPNINKL	5169	ENPP3
151	YMYEGPAPRI	5169	ENPP3

Настоящее изобретение далее в основном относится к пептидам в соответствии с настоящим изобретением для применения в лечении пролиферативных заболеваний, таких как, например, рак легких, рак головного мозга, рак желудка, рак толстой кишки или прямой кишки, рак печени, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, лейкоза, рак молочной железы, меланома, рак яичника и рак пищевода

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: 114. Особенно предпочтительными являются пептиды - в отдельности или в комбинации, выбранные из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 63 (см. табл. 1) и их применение в иммунотерапии рака ПЖК, рака легких, рака головного мозга, рака желудка, рака толстой кишки или прямой кишки, рака печени, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, лейкозов, рака молочной железы, меланомы, рака яичника и рака пищевода и предпочтительно ПЖК.

Как показано в табл. 4А, многие из пептидов в соответствии с настоящим изобретением присутствуют в других видах опухолей и могут, таким образом, применяться в иммунотерапии при других показаниях. См. также фиг. 1Е и пример 1.

Для выбранных пептидов таблица демонстрирует, на каких дополнительных видах опухолей они были обнаружены и имели либо избыточную презентацию на более чем 5% исследованных опухолевых образцов, либо презентацию на более чем 5% исследованных опухолевых образцов с соотношением среднего геометрического для опухоли и для нормальных тканей, составляющим более 3. Избыточная презентация определяется как более высокая представленность на опухолевом образце по сравнению с образцом нормальной ткани с наивысшей презентацией.

Таблица 4А

Пептиды в соответствии с настоящим изобретением и их конкретное применение при других пролиферативных заболеваниях, в особенности при других раковых заболеваниях

SEQ ID No	Последовательность	Другие релевантные органы / заболевания
1	ALIVSLPYL	Печень
2	ILWREVVTL	Яичник
5	YLYPNLTRL	Печень
8	GLASFKSFL	Поджелудочная железа
12	ALDPSGNQLI	Яичник
14	ALLTETIFL	Лейкоциты
15	ILIKHLVKV	Печень

037050

16	FMPEELPQL	Поджелудочная железа, молочная железа, яичник
21	RLIQGDQILSV	Легкие, толстая кишка, прямая кишка, печень, яичник
23	YIQEVVQYI	Печень
24	FTLGTTVFL	Печень, предстательная железа, лейкоциты, пищевод
26	SLMEILYTL	Толстая кишка, прямая кишка, поджелудочная железа, предстательная железа, яичник
27	SLSDLLVSL	Легкие, печень, поджелудочная железа, лейкоциты
28	FIADLVVGL	Меланома
29	ILLDLEQAL	Легкие, поджелудочная железа, предстательная железа, молочная железа, яичник
30	QLFYTKIFL	Легкие, толстая кишка, прямая кишка, яичник
31	VLFGLDPAVIKV	Головной мозг, яичник
32	FLAGGIRGSGA	Желудок
33	FIADVVEKI	Легкие, лейкоциты, яичник
34	ELNNQNFYL	Меланома, пищевод
36	SLFGKKYIL	Толстая кишка, прямая кишка
37	VLAPVILML	Легкие, толстая кишка, прямая кишка, поджелудочная железа, яичник
38	VLLDTILQL	Головной мозг, печень, поджелудочная железа, меланома, яичник
39	YLLNLNHLGL	Легкие, печень, лейкоциты
44	ALFSFVTAL	Легкие, меланома, яичник
45	ALLGIPLTL	Предстательная железа, яичник, пищевод
46	GLSEVLVQI	Толстая кишка, прямая кишка

037050

47	TLAEVRVQEI	Печень, меланома
49	VLIVEVPGV	Яичник
50	SLSDHIVLL	Легкие
51	NLWPMILTL	Легкие, поджелудочная железа, пищевод
52	SILDAVQRV	Легкие, головной мозг, поджелудочная железа, яичник
54	ALVAKGLVQA	Меланома, яичник
55	YLALILPVL	Меланома
56	ILMDFSNSM	Поджелудочная железа
59	SLKNNVSV	Поджелудочная железа, яичник, пищевод
61	SLMGILLRI	Лейкоциты
63	GLIEDHFDVTV	Легкие, толстая кишка, прямая кишка, предстательная железа, лейкоциты, меланома, яичник
65	IYGGSVTGA	Молочная железа
66	TLLKTIKV	Головной мозг
67	LLDVLAPLV	Легкие, желудок, печень, поджелудочная железа, молочная железа, пищевод
68	YVLTQPPSV	Легкие, поджелудочная железа, лейкоциты, пищевод
69	ILADLLPSL	Легкие, головной мозг, поджелудочная железа, молочная железа, яичник
72	YSLEKVFGI	Печень
73	GLDGIPFTV	Головной мозг, поджелудочная железа, молочная железа, меланома
78	ALLDTVVQA	Печень, предстательная железа
79	ALADIVWRA	Легкие, головной мозг, толстая кишка, прямая кишка, печень, поджелудочная железа, предстательная железа, яичник, пищевод

037050

82	SLLQATDFMSL	Толстая кишка, прямая кишка, поджелудочная железа, пищевод
84	YLMDEGAHL	Печень
85	FVMSEIRTV	Печень
86	GLLQGKLALL	Печень, меланома
87	LADGVQKV	Молочная железа, меланома
88	TLAELHISL	Яичник
90	FTLEKNFVI	Предстательная железа
91	MLLSSLVSL	Легкие, печень
93	GVMAGDIYSV	Легкие, толстая кишка, прямая кишка, печень, пищевод
94	ILHMKVYDL	Печень
96	TLAETLVNL	Легкие, желудок, толстая кишка, прямая кишка, поджелудочная железа, предстательная железа, молочная железа, яичник, пищевод
97	TLISELVQA	Легкие, толстая кишка, прямая кишка, поджелудочная железа, предстательная железа, молочная железа, меланома, яичник, пищевод
98	KIPPVSPSI	Легкие, печень, молочная железа
99	GLAPHLEQI	Печень, яичник
100	KLNVAPLAV	Легкие, головной мозг, толстая кишка, прямая кишка, печень, поджелудочная железа, меланома, яичник
101	HIYDKAFITV	Печень, яичник
102	LLFDVHTTL	Легкие, желудок
103	KLQDGLLHI	Головной мозг, толстая кишка, прямая кишка, печень
104	ALFEGVVRQI	Печень, меланома, пищевод

037050

105	ALADLDELLIRA	Поджелудочная железа, меланома
107	VLMDLKALLL	Предстательная железа, лейкоциты, яичник
108	VLISVLQAI	Лейкоциты
109	YLWSRVEKL	Поджелудочная железа, яичник
110	LLDLHSYLL	Желудок, лейкоциты
111	TLLETMLL	Поджелудочная железа, молочная железа
112	LLFDHLEPIEL	Лейкоциты
113	SLFDWNVKL	Печень, предстательная железа
114	ALAVNISAA	Легкие, головной мозг, печень, поджелудочная железа, пищевод
115	LLDPKTIFL	Толстая кишка, прямая кишка, печень
116	GLVDIMVHL	Яичник
117	VLFGELPAL	Легкие, поджелудочная железа, молочная железа, яичник
119	RLHDENILL	Легкие, головной мозг, толстая кишка, прямая кишка, печень, поджелудочная железа, предстательная железа, яичник, пищевод
121	ALLRTVVSU	Легкие, печень, поджелудочная железа, молочная железа, яичник
122	SLDPSSPQV	Печень
123	YVDPVITSI	Легкие
124	ILSPLSVAL	Печень, поджелудочная железа
125	KLDPTKTTL	Предстательная железа
126	KIQEILTQV	Легкие, головной мозг, желудок, толстая кишка, прямая кишка, печень, поджелудочная железа, лейкоциты, яичник, пищевод
127	VLAPLFVYL	Легкие, поджелудочная железа, молочная железа, меланома

037050

128	YLEEDVYQL	Легкие, поджелудочная железа
129	VLAPRVLRA	Легкие, головной мозг, толстая кишка, прямая кишка, печень, поджелудочная железа, яичник
130	ALPTVLVGV	Легкие, головной мозг, желудок, толстая кишка, прямая кишка, печень, меланома, пищевод
131	VMAGDIYSV	Легкие, печень, поджелудочная железа, пищевод
132	SVASTITGV	Печень, молочная железа
133	QLIDYERQL	Легкие, толстая кишка, прямая кишка, печень, поджелудочная железа, пищевод
134	VADKIHSV	Желудок, поджелудочная железа, пищевод
135	VVDEGPTGV	Легкие, головной мозг, желудок, печень, поджелудочная железа, лейкоциты, молочная железа, яичник, пищевод
136	YQDPHSTAV	Головной мозг, печень
137	TLVAIVVGV	Легкие, головной мозг, желудок, толстая кишка, прямая кишка, печень, поджелудочная железа, предстательная железа, молочная железа, яичник
138	SLDTLMTYV	Легкие, головной мозг, толстая кишка, прямая кишка, поджелудочная железа, предстательная железа, лейкоциты, пищевод
139	ILNVDGLIGV	Головной мозг, толстая кишка, прямая кишка, печень, предстательная железа
140	SLANNVTSV	Легкие, головной мозг, поджелудочная железа, меланома, яичник, пищевод

141	LLVDDSFLHTV	Головной мозг, печень, поджелудочная железа, меланома, яичник, пищевод
142	SVDVSPPKV	Легкие, поджелудочная железа, меланома, пищевод
143	ALFVRLALA	Легкие, головной мозг, желудок, толстая кишка, прямая кишка, печень, меланома, пищевод
144	RLLDVLAPLV	Печень
145	SLHFLILYV	Легкие, головной мозг, толстая кишка, прямая кишка, печень, меланома, яичник
146	KLIDLSQVMYL	Легкие, толстая кишка, прямая кишка, поджелудочная железа, яичник
147	ALADKELLPSV	Легкие, толстая кишка, прямая кишка, печень, поджелудочная железа, меланома, яичник
148	KLLTEVHAA	Легкие, желудок, толстая кишка, прямая кишка, печень, поджелудочная железа, молочная железа, яичник, пищевод
149	SILTIEDGIFEV	Легкие, головной мозг, толстая кишка, прямая кишка, печень, поджелудочная железа, предстательная железа, лейкоциты, молочная железа, меланома, яичник
150	TLMPNINKL	Печень

Для выбранных пептидов табл. 4Б демонстрирует, как и табл. 4А, на каких дополнительных видах опухолей они были обнаружены с избыточной презентацией (включая специфическую презентацию) на более чем 5% исследованных опухолевых образцов или презентацией на более чем 5% исследованных опухолевых образцов с соотношением среднего геометрического для опухоли и для нормальных тканей, составляющим более 3. Избыточная презентация определяется как более высокая представленность на опухолевом образце по сравнению с образцом нормальной ткани с наивысшей презентацией. Нормальными тканями, на основе которых проводили испытание на избыточную презентацию, были жировая ткань, ткань надпочечной железы, клетки крови, кровеносные сосуды, ткань костного мозга, головного мозга, хрящевая ткань, ткань пищевода, глаз, ткань желчного пузыря, сердца, почек, толстой кишки, печени, легких, лимфатических узлов, нервная ткань, ткань поджелудочной железы, паразитовидной железы, брюшины, гипофиза, плевры, слюнной железы, скелетных мышц, кожа, ткань тонкого кишечника, селезенки, желудка, вилочковой железы, щитовидной железы, трахеи, мочеточника, мочевого пузыря.

Пептиды в соответствии с настоящим изобретением и их конкретное применение при других пролиферативных заболеваниях, в особенности при других раковых заболеваниях

SEQ ID No	Последовательность	Дополнительные виды
2	ILWREVVTL	Меланома, НХЛ
4	FLSQDIITV	Рак матки
6	VLFELSKTV	ОМЛ
8	GLASFKSFL	Меланома, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
10	KLLQNNYGL	РМЖ, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
12	ALDPSGNQLI	Рак головного мозга
13	KIMAQILTV	ХЛЛ, НХЛ
14	ALLTETIFL	НХЛ
15	ILIKHLVKV	Рак матки, НХЛ
17	ILAQQVHAL	Рак матки
18	YVLDLAAKV	МРЛ, ХЛЛ, РМЖ, меланома, рак матки, НХЛ
20	AVANTTFTV	Рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак матки
21	RLIQGDQILSV	МРЛ, РМЖ, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, РЯ
24	FTLGTTVFL	Меланома, рак матки, НХЛ

037050

26	SLMEILYTL	Меланома, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, ОМЛ, РЯ, МРЛ
27	SLSDLLVSL	КРК, меланома, рак матки, ОМЛ, НХЛ
28	FIADLVVGL	МРЛ, ХЛЛ, ОМЛ, НХЛ
29	ILLDLEQAL	Меланома, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, ОМЛ, НХЛ, РЯ
30	QLFYTKIFL	Меланома, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
33	FIADVVEKI	МРЛ, РМЖ, рак пищевода
34	ELNNQNFYL	КРК, рак мочевого пузыря, ОМЛ, НХЛ
36	SLFGKKYIL	Рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
38	VLLDTILQL	НМРЛ, МРЛ, ХЛЛ, РМЖ, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, ОМЛ, НХЛ, РЯ
39	YLLNLNHLGL	НХЛ
40	YIQEHLLQI	Меланома
43	YLKDELDEL	Рак пищевода, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, НХЛ
45	ALLGIPLTL	РМЖ, меланома, рак мочевого пузыря, рак матки, РЯ
46	GLSEVLVQI	МРЛ, ГКК, меланома, рак мочевого пузыря, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, НХЛ
48	VVASNIMEV	РМЖ, меланома
49	VLIVEVPGV	Рак желчного пузыря, рак желчных протоков, РЯ
50	SLSDHIVLL	РПЖ, меланома, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
51	NLWPMILTL	Меланома, рак матки, рак желчного пузыря, рак

037050

		желчных протоков, рак пищевода
52	SILDAVQRV	МРЛ, РМЖ, меланома, рак матки
54	ALVAKGLVQA	ХЛЛ
55	YLALILPVL	ХЛЛ
56	ILMDFSNSM	Рак мочевого пузыря, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
57	SLQKEILYL	Меланома
59	SLKNNVSV	Меланома, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
61	SLMGILLRI	РМЖ
62	VLGPAFLVQL	Рак матки
63	GLIEDHFDVTV	МРЛ
64	LLAASVALA	Рак головного мозга, ОМЛ
65	IYGGSVTGA	ХЛЛ, меланома, рак мочевого пузыря, рак матки
66	TLLKTIKIV	Меланома, рак мочевого пузыря
67	LLDVLAPLV	КРК, меланома, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
68	YVLTQPPSV	РМЖ
69	ILADLLPSL	МРЛ, меланома, рак пищевода, рак матки, ОМЛ, ХЛЛ
72	YSLEKVFGI	Рак головного мозга, РЖ, КРК, РПрЖ, РМЖ, меланома, РЯ, рак мочевого пузыря, ОМЛ, РПЖ
73	GLDGIPFTV	РЖ, рак мочевого пузыря, рак матки, ОМЛ
75	FLIKSINLV	ХЛЛ, меланома, ОМЛ
76	VLADDHLIEV	ГКК, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
77	SLIKHKIML	КРК, меланома, рак матки
78	ALLDTVVQA	РМЖ
79	ALADIVWRA	МРЛ, РМЖ, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, рак пищевода, РЯ
80	KLASMLETL	Меланома

037050

81	SLLPALPKL	PMЖ
82	SLLQATDFMSL	НМРЛ, рак головного мозга, PMЖ, меланома, рак матки, НХЛ, РПЖ
83	IQWSIVPEV	ХЛЛ, меланома, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, ОМЛ, НХЛ
84	YLMDEGAHL	Рак желчного пузыря, рак желчных протоков
85	FVMSEIRTV	Рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
86	GLLQGKLALL	Рак матки, НХЛ
88	TLAELHISL	ХЛЛ, рак пищевода
89	SLLLAVTEV	МРЛ, PMЖ, меланома, рак мочевого пузыря
90	FTLEKNFVI	КРК, PMЖ, РПЖ
91	MLLSSLVSL	МРЛ, меланома, рак мочевого пузыря, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
92	FLFRDILEL	Меланома, ОМЛ
93	GVMAGDIYSV	Рак желчного пузыря, рак желчных протоков, РРЖ
95	KLTDVGIATL	Меланома, НХЛ
96	TLAETLVNL	МРЛ, ГКК, ХЛЛ, меланома, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, ОМЛ, НХЛ
97	TLISELVQA	МРЛ, РЖ, ГКК, ХЛЛ, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, НХЛ
98	KIPPVSPSI	Рак матки, НХЛ
99	GLAPHLEQI	PMЖ, меланома, ОМЛ, НХЛ
100	KLNVAPLAV	ХЛЛ, PMЖ, рак матки, ОМЛ, НХЛ, РЯ
101	HIYDKAFITV	МРЛ, PMЖ
102	LLFDVHTTL	МРЛ, меланома, рак мочевого пузыря, рак матки, ОМЛ
103	KLQDGLLHI	МРЛ, РПЖ, меланома, РЯ, НХЛ
104	ALFEGVVRQI	Рак мочевого пузыря
105	ALADLDELLIRA	PMЖ
106	VLMDLKALL	ОМЛ
107	VLMDLKALLL	ОМЛ
108	VLISVLQAI	PMЖ, ОМЛ, НХЛ
109	YLWSRVEKL	ХЛЛ, НХЛ
110	LLDLHSYLL	Рак матки
111	TLLETEMLL	Рак мочевого пузыря
112	LLFDHLEPIEL	PMЖ, НХЛ
113	SLFDWNVKL	МРЛ, PMЖ, рак пищевода, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, ОМЛ, НХЛ
114	ALAVNISAA	РЖ, КРК, ХЛЛ, PMЖ, меланома, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, ОМЛ, НХЛ, РПЖ

НМРЛ = немелкоклеточный рак легких,

МРЛ = мелкоклеточный рак легких,

ПКК = рак почки,

КРК = рак толстого или прямого кишечника,

РЖ = рак желудка,

ГКК = рак печени,

РПЖ = рак поджелудочной железы,

РПрЖ = рак предстательной железы,

PMЖ = рак молочной железы,

ККМ = карцинома клеток Меркеля,
РЯ = рак яичника,
НХЛ = неходжкинская лимфома,
ОМЛ = острый миелоидный лейкоз,
ХЛЛ = хронический лимфоцитарный лейкоз.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID NO: 21, 27, 29, 30, 33, 37, 39, 44, 50, 51, 52, 63, 67, 68, 69, 79, 91, 93, 96, 97, 98, 100, 102, 114, 117, 119, 123, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 165, 137, 138, 140, 142, 143, 145, 146, 147, 148 и 149 - в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации - для лечения рака легких.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID NO: 31, 38, 52, 66, 69, 73, 79, 100, 102, 103, 114, 119, 126, 129, 130, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 143, 145 и 149 - в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации - для лечения рака головного мозга.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID NO: 32, 67, 96, 110, 126, 130, 134, 135, 137, 143 и 148 - в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации - для лечения рака желудка.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID NO: 21, 26, 30, 36, 37, 46, 63, 79, 82, 93, 96, 97, 100, 103, 115, 119, 126, 129, 130, 133, 137, 138, 139, 143, 145, 146, 147, 148 и 149 - в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации - для лечения колоректального рака.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID NO: 1, 5, 15, 21, 23, 24, 27, 38, 39, 47, 67, 72, 78, 79, 84, 85, 86, 91, 93, 94, 98, 99, 100, 101, 103, 104, 113, 114, 115, 119, 121, 122, 124, 126, 129, 130, 131, 132, 133, 135, 136, 137, 139, 141, 143, 144, 145, 147, 148, 149 и 150 - в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации - для лечения рака печени.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID NO: 8, 16, 26, 27, 29, 37, 38, 51, 52, 56, 59, 67, 68, 69, 73, 79, 82, 96, 97, 100, 105, 109, 111, 114, 117, 119, 121, 124, 126, 127, 128, 129, 131, 133, 134, 135, 137, 138, 140, 141, 142, 146, 147, 148 и 149 - в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации - для лечения рака поджелудочной железы.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID NO: 24, 26, 29, 45, 63, 78, 79, 90, 96, 97, 107, 113, 119, 125, 137, 138, 139 и 149 - в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации - для лечения рака предстательной железы.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID NO: 14, 24, 27, 33, 39, 61, 63, 68, 107, 108, 110, 112, 126, 135, 138 и 149 - в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации - для лечения лейкозов.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID NO: 16, 29, 65, 67, 69, 73, 87, 96, 97, 98, 111, 117, 121, 127, 132, 135, 137, 148 и 149 - в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации - для лечения рака молочной железы.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID NO: 28, 34, 38, 44, 47, 54, 55, 63, 73, 86, 87, 97, 100, 104, 105, 127, 130, 140, 141, 142, 143, 145, 147 и 149 - в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации - для лечения меланомы.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID NO: 2, 12, 16, 21, 26, 29, 30, 31, 33, 37, 38, 44, 45, 49, 52, 54, 59, 63, 69, 79, 88, 96, 97, 99, 100, 101, 107, 109, 116, 117, 119, 121, 126, 129, 135, 137, 140, 141, 145, 146, 147, 148 и 149 - в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации - для лечения рака яичника.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID NO: 24, 34, 45, 51, 59, 67, 68, 79, 93, 96, 97, 104, 114, 119, 126, 130, 131, 133, 134, 135, 138, 140, 141, 142, 143 и 148 - в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации - для лечения рака пищевода.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению пептидов в соответствии с настоящим изобретением для - предпочтительно комбинированного - лечения пролиферативного заболевания, выбранного из группы: ПКК, рак легкого, рак головного мозга, рак желудка, колоректальный рак, рак печени, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, лейкозы, рак молочной железы, меланома, рак яичника и рак пищевода и предпочтительно ПКК.

Предпочтительно настоящее изобретение относится к применению пептидов в соответствии с настоящим изобретением в соответствии с последовательностями с SEQ ID NO: 1 и/или 15 для - предпочтительно комбинированного - лечения пролиферативного заболевания, выбранного из группы: ПКК, рак легкого, рак головного мозга, рак желудка, колоректальный рак, рак печени, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, лейкозы, рак молочной железы, меланома, рак яичника и рак пищевода и предпочтительно ПКК.

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: 114.

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 последовательностями с SEQ ID 1 по SEQ ID 151 в соответствии с настоящим изобретением.

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

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

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

Настоящее изобретение далее относится к способу в соответствии с настоящим изобретением, где антигенпрезентирующая клетка включает вектор экспрессии, способный экспрессировать или экспрессирующий указанный пептид, содержащий последовательность с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 114, предпочтительно содержащий последовательность с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 63, 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 aberrantly экспрессируют полипептид, включающий любую аминокислотную последовательность в соответствии с настоящим изобретением, причем способ включает введение пациенту эффективного числа Т-клеток, полученных в соответствии с настоящим изобретением.

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

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

Настоящее изобретение далее относится к применению в соответствии с изобретением, где указанные раковые клетки являются клетками ПКК, рака легких, рака головного мозга, рака желудка, рака толстой кишки или прямой кишки, рака печени, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, лейкозов, рака молочной железы, меланомы, рака яичника и рака пищевода и предпочтительно клетками ПКК.

Настоящее изобретение далее относится к биомаркерам, основанным на пептидах в соответствии с настоящим изобретением, в контексте изобретения называемых "мишенями", которые могут быть использованы при постановке диагноза рака, предпочтительно ПКК. 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.

ABCC3 ассоциирован с гепатоклеточной карциномой, раком яичника, раком прямой кишки, остеосаркомой, раком молочной железы, немелкоклеточным раком легких, мультиформной глиобластомой и протоковой аденокарциномой поджелудочной железы (Mohelnikova-Duchonova et al., 2013; Molina-Pinelo et al., 2014; Goode et al., 2014; Liu et al., 2014c; Yu et al., 2014; Sedlakova et al., 2015; Zuniga-Garcia et al., 2015; Wang et al., 2014c).

ACLY aberrantly экспрессируется клетками различных опухолей, таких как рак молочной железы, печени, толстой кишки, легких и предстательной железы, и обратно коррелирует со стадией и дифференциацией опухоли (Zu et al., 2012).

Избыточная экспрессия ADAM8 при раке поджелудочной железы ассоциируется с усилением миграции и инвазивности клеток протоковой аденокарциномы поджелудочной железы (Schlomann et al., 2015). ADAM8 задействован в процессах клеточной миграции и инвазии при раке легких, почечноклеточной карциноме и раковых опухолях головного мозга (Mochizuki and Okada, 2007).

Гиперметилирование гена ADCY5 и снижение экспрессии мРНК возникают при остром лимфобластном лейкозе, хроническом лимфоцитарном лейкозе и аденокарциноме легких (Kuang et al., 2008; Tong et al., 2010; Sato et al., 2013a).

AHNAK2 является важным элементом неклассического пути секреции фактора роста фибробластов 1 (FGF1), фактора, который задействован в росте и инвазии опухоли (Kirov et al., 2015).

Как было продемонстрировано, экспрессия AIFM2 понижена в большинстве опухолей человека (Wu et al., 2004; Mei et al., 2006). AIFM2 был идентифицирован как один из девяти генов, которые были ассоциированы с функциональной супрессией онкогенности в клеточных линиях рака яичника (Notaridou et al., 2011).

Как было показано, уровень AKR1A1 повышен при раке молочной железы и ассоциируется с раком легких и рака гортани (Penning, 2014; Hlavac et al., 2014; Kim et al., 2012).

Экспрессия ALPK2 понижена при колоректальной аденоме и, возможно, играет роль в переходе ткани нормальных крипт толстой кишки в аденому (Yoshida et al., 2012). ALPK2 демонстрирует тесную взаимосвязь между потерей числа копий и недостаточной экспрессией при раке желудка (Junnilla et al., 2010).

Как было продемонстрировано, уровень ANGPTL4 повышен при раке молочной железы, серозном раке яичника и ассоциируется с глиобластомой, гепатоклеточной карциномой, плоскоклеточной карциномой полости рта и раком легких (Ferguson et al., 2013; Tanaka et al., 2015; Ng et al., 2014; Garner et al., 2015; Schumann et al., 2015; Johnson et al., 2015).

Уровень экспрессии APO1 понижен в тканях и клеточных линиях почечноклеточной карциномы (Hu et al., 2012).

ARRDC3 ассоциируется с раком молочной железы и раком предстательной железы (Wang et al., 2014a; Huang et al., 2012a).

Мутации сдвига рамки считывания ATG2B распространены при карциномах желудка и толстой кишки с высокой микросателлитной нестабильностью (Kang et al., 2009).

Как было показано, экспрессия ATR11A повышена при колоректальном раке и ассоциируется с лимфобластным лейкозом, и этот белок предложен в качестве биомаркера распространения метастазов при колоректальном раке (Miyoshi et al., 2010; Zhang et al., 2005).

Уровень ATR2A1, как было продемонстрировано, повышен при раковой кахексии (Fontes-Oliveira et al., 2013).

ATR2A2 ассоциируется с раком кожи, раком толстой кишки и раком легких (Korosec et al., 2006; Novnanian, 2007).

SACNA1H ассоциируется с аденомами, вырабатывающими альдостерон, раком предстательной железы и раком молочной железы (Felizola et al., 2014; Asaga et al., 2006; Gackiere et al., 2013).

SACNA1I ассоциируется с раком толстой кишки, раком молочной железы и раком предстательной железы (Basson et al., 2015).

CARD8 экспрессируется в высокой степени в нескольких клеточных линиях рака, в том числе рака яичника, молочной железы и легких, а также в тканях, полученных от пациентов с колоректальной карциномой, раком желудка или молочной железы (Pathan et al., 2001; Yamamoto et al., 2005).

CST6A ассоциируется с опухолями мужских половых клеток и злокачественными меланомами (Tanic et al., 2006; Alagaratnam et al., 2011).

Уровень CIT часто повышен в клетках гепатоклеточной карциномы (ГКК) по сравнению с прилегающими неопухолевыми тканями. Нокдаун CIT с помощью РНК-интерференции подавляет онкогенность клеток ГКК *in vivo* (Fu et al., 2011).

Снижение уровня CLIC4 в опухолевых клетках и его повышение в строме опухоли распространено при многих видах рака человека, в том числе при раке почек, яичника, молочной железы, легких и раковых заболеваниях кожи, и является признаком злокачественного прогрессирования (Suh et al., 2007a; Okudela et al., 2014; Suh et al., 2007b).

О дифференцированной экспрессии COL18A1 сообщалось для рака мочевого пузыря, рабдоидных опухолей и карциномы яичника, и, как было показано, специфические полиморфизмы гена увеличивают риск развития спорадического рака молочной железы (Fang et al., 2013; Gadd et al., 2010; Lourenco et al., 2006; Peters et al., 2005).

COL6A2 ассоциируется с раком шейки матки, плохой общей выживаемостью при серозном раке яичника высокой степени злокачественности, лимфобластном лейкозе из предшественников В-лимфоцитов, гепатоклеточной карциноме, первичных и метастатических опухолях головного мозга, плоскоклеточной карциноме легких, плоскоклеточной карциноме головы и шеи, и он был описан в качестве потенциального инструмента анализа ДНК-метилирования при раке шейки матки (Cheon et al., 2014; Chen et al., 2014c; Vachani et al., 2007; Liu et al., 2010b; Seong et al., 2012; Hogan et al., 2011).

CUL7 ассоциируется с раком предстательной железы и гепатоклеточной карциномой (Wang et al., 2014b; Paradis et al., 2013).

Уровень экспрессии CYB5A понижен при гепатоклеточной карциноме (Khan et al., 2013a). CYB5A является прогностическим фактором для протоковой аденокарциномы поджелудочной железы, который проявляет свою функцию подавления опухоли за счет инициации аутофагии и модулирования TRAF6 (Giovannetti et al., 2014). CYB5A кодирует фермент, который детоксифицирует канцерогенные молекулы и является прогностическим фактором для рака поджелудочной железы (Blanke et al., 2014; Giovannetti et al., 2014).

Экспрессия CYFIP2 повышена во вновь возникших лимфатических узлах при раке молочной железы (Gantsev et al., 2013). Экспрессия CYFIP2 понижена в образцах опухолей желудка человека по сравнению с контрольными тканями (Cheng et al., 2013). CYFIP2 является одним из нескольких генов, связанных с апоптозом, метилированных при хроническом лимфоцитарном лейкозе (Halldorsdottir et al., 2012).

CYP2J2 является ферментом, который, как было продемонстрировано, экспрессируется в избытке в различных видах опухолей человека, включая рак пищевода, легких, молочной железы, желудка, печени и толстой кишки. CYP2J2 повышает пролиферацию и ингибирует апоптоз клеток карциномы, стимулируя фосфорилирование EGFR и активацию сигнальных путей PI3K и MAPK, и далее участвует в метаболизме ингибиторов тирозинкиназы, тем самым вызывая устойчивость к противораковым лекарственным средствам (Jiang et al., 2005; Najjuz et al., 2014).

Уровень DCBLD2 повышен при глиобластоме и раковых опухолях головы и шеи (РГШ) и необходим для стимулируемого EGFR онкогенеза (Feng et al., 2014). Кроме того, уровень DCBLD2 повышен в сублиниях и образцах ткани высоко метастатического рака легких (Koshikawa et al., 2002). Напротив, экспрессия DCBLD2 подавлена при гиперметилировании его промотора при раке желудка (Kim et al., 2008).

DDX41 ассоциируется с острым миелоидным лейкозом (Antony-Debre and Steidl, 2015).

DROSHA, один из двух важнейших ферментов для синтеза микроРНК, избыточно экспрессируется в клетках нескольких видов рака, в том числе гастроинтестинальных опухолей, рака молочной железы и рака шейки матки и, по-видимому, усиливает пролиферацию, образование колоний и миграцию опухолевых клеток (Avery-Kiejda et al., 2014; Havens et al., 2014; Zhou et al., 2013).

Однонуклеотидные полиморфизмы в гене DUSP14 ассоциируются с изменением риска возникновения меланомы (Yang et al., 2014a; Liu et al., 2013).

Уровень EGFR, как было продемонстрировано, повышен при раке молочной железы и аденоидной карциноме слюнных желез и ассоциируется с немелкоклеточным раком легких, гепатоклеточной карциномой и колоректальным раком (Dienstmann et al., 2015; Wang et al., 2015b; Steinway et al., 2015; Xiao et al., 2015; Inoue et al., 2015).

Экспрессия EGLN3, как было показано, повышена при немелкоклеточном раке легких и почечноклеточных карциномах. Более того, EGLN3 ассоциируется со светлоклеточной почечноклеточной карциномой и колоректальным раком (Tanaka et al., 2014; Yang et al., 2014d; Toth et al., 2014; Chu et al., 2014).

Экспрессия ENO1, как было показано, повышена при немелкоклеточном раке легких. Кроме того, ENO1 ассоциируется с карциномой эндометрия, протоковой аденокарциномой поджелудочной железы, глиобластомой и назофарингеальной карциномой (Yang et al., 2014b; Naryzhnyi et al., 2014; Principe et al., 2015; Fu et al., 2015; Zhao et al., 2015a).

ENO2 ассоциируется с раком легких, солидной нейроэндокринной карциномой, гранулярноклеточными опухолями и раком поджелудочной железы (Sigari et al., 2014; Zizi-Sermpetzoglou et al., 2014; Liu et al., 2014a; Bedir et al., 2015; Wang et al., 2013b).

ENO3 ассоциируется с В-клеточной лимфомой, альвеолярной мягкотканной саркомой, рабдомиосаркомой и нейробластомой и нейробластомой (Oka et al., 1989; Mukai et al., 1986; Royds et al., 1985; Ishiguro et al., 1984).

ENPP3 ассоциируется с нейробластомой, колоректальным раком II стадии, плоскоклеточной карциномой головы и шеи, острым базофильным лейкозом и карциномой желчных протоков (Agesen et al., 2012; Staal-Viliare et al., 2007; Gomez-Villafuertes et al., 2014; Yano et al., 2004; Thiel et al., 2011).

ERAP1 ассоциируется с карциномой шейки матки, почечноклеточной карциномой, плоскоклеточной карциномой пищевода, меланомой, карциномой яичника и нейробластомой (Mehta et al., 2015; Forloni et al., 2010; Liu et al., 2010a; Kamphausen et al., 2010; Ayshangul et al., 2011; Stoehr et al., 2013).

Как было показано, уровень экспрессии ESM1 повышен при раке желудка и ассоциируется с гепатобластомой, назофарингеальной карциномой и раком яичника и может быть потенциальным биомаркером рака желудка (Yu et al., 2013; Dong et al., 2014; Lv et al., 2014; El Behery et al., 2013).

Как было показано, уровень FHL2 повышен при остром миелоидном лейкозе, раке яичника, раке легких, карциноме толстой кишки, раке молочной железы, протоковой аденокарциноме поджелудочной железы и злокачественной меланоме человека и понижен при раке предстательной железы и рабдомиосаркоме (Kleiber et al., 2007; Westphal et al., 2015; Qian et al., 2010; Zienert et al., 2015).

FKBP10 был идентифицирован в качестве нового гена, который участвует в приобретении и сохранении клетками лейкоза фенотипа, резистентного к действию адриамицина (Sun et al., 2014b). FKBP10 ассоциировался с колоректальным раком за счет повышения его уровня (Olesen et al., 2005). Напротив, недостаточная экспрессия FKBP10 была характерна для эпителиальных карцином яичника (Quinn et al., 2013).

FLT1 ассоциируется с раком толстой кишки, раком предстательной железы, немелкоклеточным раком легких и раком поджелудочной железы (Awasthi et al., 2015; Heist et al., 2015; Tsourlakis et al., 2015; Zhang et al., 2015).

FZD1 ассоциируется с раком пищевода, карциномой щитовидной железы, саркомой матки, раком предстательной железы, плоскоклеточной/аденосквамозной карциномой и аденокарциномой желчного пузыря, раком толстой кишки и раком молочной железы (Goksel et al., 2014; Hung et al., 2014; Davidov et al., 2014; Su et al., 2015; Zhang et al., 2012a; Planutis et al., 2013; Devaney et al., 2013; Li et al., 2014a).

Как было продемонстрировано, уровень FZD2 повышен при раке пищевода и ассоциируется с гастроинтестинальной стромальной опухолью, аденокистозной карциномой слюнных желез и колоректальным раком (Wang and Zheng, 2014; Ding et al., 2015; Prakash et al., 2005; Liu et al., 2014b).

Как было продемонстрировано, уровень FZD7 повышен при раке яичника и ассоциируется с раком шейки матки, гепатоклеточной карциномой, колоректальным раком, меланомой, раком молочной железы, раком желудка и центральной нейроцитомой (Anastas et al., 2014; Li et al., 2014c; Gonzalez et al., 2014; Song et al., 2014; Deng et al., 2015; Asad et al., 2014; Vasiljevic et al., 2013; Rocken and Warneke, 2012; Day et al., 2013).

Активность GAL3ST1 повышена в ткани почечноклеточной карциномы (ПКК) и клеточной линии SMK2-R3 ПКК (Honke et al., 1996). Уровень экспрессии GAL3ST1 повышен в клетках эпителиальной карциномы яичника по сравнению с нормальной тканью стромы яичника и нормальными эпителиальными клетками на поверхности яичника (Liu et al., 2010c).

GALNT2, N-ацетилгалактозаминилтрансфераза 2, как было показано, проявляет антипролиферативную и антиметастатическую активность за счет снижения уровня MMP-2 и TGF- β 1 в клетках рака желудка и за счет ингибирования активности рецептора EGF при гепатоклеточной карциноме, где его уровень часто понижен. Напротив, сообщалось, что избыточная экспрессия GALNT2 клетками плоскоклеточной карциномы усиливает инвазивный потенциал опухолевых клеток за счет модификации О-гликозилирования и активности EGFR (Hua et al., 2012; Lin et al., 2014; Wu et al., 2011).

Уровень GRAMD4 повышен в клеточных линиях гепатоклеточной карциномы (ГКК) и тканях ГКК, и повышенный уровень экспрессии коррелирует с клиникопатологическими характеристиками ГКК (Zhang et al., 2013).

HAVCR1 был описан в качестве кандидата в новые биомаркеры, ассоциированного со светлоклеточной карциномой яичника и почечноклеточной карциномой (Bonventre, 2014; Kobayashi et al., 2015). HAVCR1, как было показано, активирует ось IL-6/STAT-3/HIF-1A в клеточных линиях светлоклеточной почечноклеточной карциномы и определяет прогрессирование опухоли и исход для пациента (Cuadros et al., 2014). Конститутивную экспрессию HAVCR1 в почках описывали в качестве потенциального признака предрасположенности к развитию светлоклеточной почечноклеточной карциномы (Cuadros et al., 2013). Повышение уровня HAVCR1 было описано для почечноклеточных карцином и светлоклеточных карцином яичника и колоректальной карциномы (Wang et al., 2013c). Повышенный уровень HAVCR1 был описан в качестве потенциального диагностического биомаркера для колоректального рака и прогностического маркера для более долгого срока выживаемости без признаков заболевания после хирургической операции, который может быть также задействован в метастатическом каскаде при колоректальном раке (Wang et al., 2013c). Как было показано, HAVCR1 ассоциируется с T-клеточным лейкозом из больших гранулярных лимфоцитов (Wlodarski et al., 2008).

HSF2BP кодирует HSF2-связывающий белок, который ассоциируется с HSF2, и может быть задействован в модулировании активации HSF2 (RefSeq, 2002).

HSF4 кодирует транскрипционный фактор теплового шока 4, который активирует гены реакции на тепловой шок в условиях теплового или иного стресса (RefSeq, 2002). Уровень HSF4, как было продемонстрировано, понижен при глиобластоме (Mustafa et al., 2010).

Различные исследования позволяют предположить, что HSPA2 играет важную роль в прогрессии рака шейки матки, почечноклеточной карциномы и рака мочевого пузыря. Полиморфизмы этого гена ассоциируются с развитием рака желудка (Ferrer-Ferrer et al., 2013; Garg et al., 2010a; Garg et al., 2010b; Singh and Suri, 2014).

Как было продемонстрировано, HSPA8 избыточно экспрессируется клетками плоскоклеточной карциномы пищевода, и высокие уровни экспрессии HSPA8 в клетках рака пищевода *in vitro* противодействовали апоптозу этих клеток, индуцируемому окислительным стрессом. Кроме того, HSPA8 экспрессируется в избытке при множественной миеломе и карциноме толстой кишки, и индуцированная BCR-ABL1 экспрессия HSPA8 способствует выживаемости клеток при хроническом миелоидном лейкозе (Chatterjee et al., 2013; Dadkhah et al., 2013; Jose-Eneriz et al., 2008; Kubota et al., 2010; Wang et al., 2013a).

HSPG2 ассоциируется с меланомой, плоскоклеточной карциномой полости рта, светлоклеточной почечноклеточной карциномой и опухолью предстательной железы, и его пониженный уровень был продемонстрирован для гепатоклеточной карциномы и опухоли толстой кишки (Nikitovic et al., 2014; Warren et al., 2014; Gbormittah et al., 2014; Zaghloul et al., 2015; Kawahara et al., 2014; Suhovskih et al., 2015; 2015; Elewa et al., 2015; Lai et al., 2011).

HTRA1 ассоциируется с гепатоклеточной карциномой, лимфой маргинальной зоны селезенки, плоскоклеточной карциномой и нейробластомой и, как было показано, его уровень понижен при раке желудка, раке молочной железы, раке желчного пузыря и аденокарциноме легких (Xu et al., 2014; D'Angelo et al., 2014; Fujinaga et al., 2014; Sahasrabuddhe et al., 2014; Franco et al., 2015; Arribas et al., 2015; Zhao et al., 2015b; Bao et al., 2015).

Как было продемонстрировано, уровень HTRA3 повышен при плоскоклеточной карциноме полости рта и карциноме щитовидной железы и понижен при раке яичника, раке молочной железы, раке эндометрия и раке легких и ассоциируется с колоректальным раком и может быть потенциальным прогностическим биомаркером рака полости рта (Karagiannis et al., 2014; Zhao et al., 2014; Moriya et al., 2015; Narkiewicz et al., 2009; Belefrod et al., 2010; Zurawa-Janicka et al., 2012; Yin et al., 2013).

IGF2BP3 кодирует инсулиноподобный фактор роста II мРНК-связывающий белок 3, онкофетальный белок, который подавляет трансляцию инсулиноподобного фактора роста II (RefSeq, 2002). Исследования *in vitro* показали, что IGF2BP3 способствует пролиферации, адгезии и инвазии опухолевых клеток. Кроме того, было продемонстрировано, что IGF2BP3 ассоциируется с агрессивными видами рака и поздними стадиями (Bell et al., 2013; Gong et al., 2014). Избыточную экспрессию IGF2BP3 описывали при многочисленных видах раковых опухолей, и она коррелировала с неблагоприятным прогнозом, поздней стадией опухолей и метастазами, как, например, при нейробластоме, колоректальной карциноме, внутривенной холангиокарциноме, гепатоклеточной карциноме, раке предстательной железы и почечноклеточной карциноме (Bell et al., 2013; Findeis-Hosey and Xu, 2012; Hu et al., 2014; Szarvas et al., 2014;

Jeng et al., 2009; Chen et al., 2011; Chen et al., 2013; Hoffmann et al., 2008; Lin et al., 2013; Yuan et al., 2009).

Недавно приобретенные и рекуррентные делеции IGLC1 были обнаружены у 3 из 45 пациентов, которые проявляли устойчивость к ингибиторам тирозинкиназы (ИТК) при хроническом миелоидном лейкозе (ХМЛ) (Nowak et al., 2010).

Потеря гетерозиготности в IGLC2 была продемонстрирована у 50% информативных случаев внутречерепных менингиом (Kim et al., 1993).

IGLJ3 является соединительным геном, используемым универсально для синтеза предпочтительной легкой цепи лямбда-иммуноглобулина при волосатоклеточном лейкозе (Forconi et al., 2008).

IGLV2-14 является третьим из наиболее распространенных генов IGLV при хроническом лимфоцитарном лейкозе (ХЛЛ) по сравнению с соответствующими репертуарами из нормальных, аутореактивных клеток и клеток новообразований (Stamatopoulos et al., 2005).

IGLV3-21 является наиболее часто встречающимся геном IGLV при хроническом лимфоцитарном лейкозе (ХЛЛ) по сравнению с соответствующими репертуарами из нормальных, аутореактивных и клеток новообразований (Stamatopoulos et al., 2005).

Уровень INADL понижен при немелкоклеточном раке легких в ответ на химиотерапию на основе комбинации препаратов цисплатина и гемцитабина (Ma et al., 2015).

Как было продемонстрировано, уровень ITGA3 повышен при колоректальной карциноме, и он ассоциируется с раком предстательной железы, эпидермоидной карциномой, карциномой желудка ранних стадий и остеосаркомой (Yang et al., 2014c; Chong et al., 2014; Lustosa et al., 2014; Ren et al., 2014; Bauer et al., 2014; Mertens-Walker et al., 2015).

ITGB4 ассоциируется с раком предстательной железы, раком желудка, раком молочной железы, плоскоклеточной карциномой полости рта и раком яичника, и, как было показано, его уровень повышен при протоковой аденокарциноме поджелудочной железы (Chen et al., 2014b; Xin et al., 2014; Zubor et al., 2015; Masugi et al., 2015; Gao et al., 2015b; Kawakami et al., 2015). ITGB4 (также называемый CD104) склонен к ассоциации с субъединицей альфа-6, и, скорее всего, он играет ведущую роль в биологических механизмах нескольких инвазивных карцином, таких как плоскоклеточная карцинома пищевода, карцинома мочевого пузыря и яичника (Kwon et al., 2013; Pereira et al., 2014; Chen et al., 2014b). Однонуклеотидный полиморфизм гена ITGB4, вероятно, влияет на степень агрессивности опухоли и выживаемость и может иметь прогностическую ценность для пациентов с раком молочной железы (Brendle et al., 2008).

IVNS1ABP ассоциируется с BCL1/JH-положительными множественными миеломами и, возможно, является потенциальным прогностическим маркером множественной миеломы (Ni et al., 2012).

Как было продемонстрировано, уровень JAG2 повышен при протоковой аденокарциноме поджелудочной железы, гепатоклеточной карциноме и ретинобластоме, и он ассоциируется с множественной миеломой, раком эндометрия, раком предстательной железы, остеосаркомой, раковыми опухолями головы и шеи и уротелиальной карциномой мочевого пузыря (Sun et al., 2014a; Li et al., 2014b; Carvalho et al., 2014; Xiao et al., 2014; Zhang et al., 2014a; Sasnauskienė et al., 2014; Lu et al., 2014; Hu et al., 2015; Li et al., 2013).

Гиперметилирование гена KCNK15 было обнаружено в нескольких клеточных линиях, включая рак толстой кишки, лейкоз и рак мочевого пузыря (Shu et al., 2006).

Как было продемонстрировано, KIF12 избыточно экспрессируется при раке молочной железы и ассоциируется с опухолями почек, раком матки и раком поджелудочной железы (Katoh and Katoh, 2005; Tan et al., 2012).

KLHDC7B ассоциируется с плоскоклеточной карциномой шейки матки и является потенциальным биомаркером плоскоклеточной карциномы шейки матки (Guo et al., 2015).

LRP2 ассоциируется с гепатоклеточной карциномой, раком поджелудочной железы, злокачественной меланомой, первичной лимфомой центральной нервной системы и светлоклеточной почечноклеточной карциномой (Fernandez-Banet et al., 2014; Andersen et al., 2015; Pedersen et al., 2010; Schuetz et al., 2005; Anderson et al., 2013).

LRRK2 ассоциируется с гормонально зависимым раком, раком молочной железы и сопутствующими некожными раковыми заболеваниями у пациентов с болезнью Паркинсона и может ассоциироваться с гематологическими раковыми образованиями у пациентов с болезнью Паркинсона (Ruiz-Martinez et al., 2014; Agalliu et al., 2015; Inzelberg et al., 2012).

MASS1 избыточно экспрессируется при многих видах рака, включая рак желудка, колоректальный рак и рак молочной железы и ассоциируется с прогрессированием ракового заболевания, метастазами и плохой выживаемостью пациентов (Huang et al., 2013; Ma et al., 2013; Stein, 2013; Wang et al., 2015a; Wang et al., 2015c; Pim et al., 2015). MASS1 способствует онкогенезу за счет воздействия на сигнальные пути бета-катенина и PI3K/AKT, что приводит к повышению уровня с-Met и бета-катенина, и на их гены-мишени, регулирующие последующие звенья сигнальных каскадов, включая с-Мус, циклин D1, caspase9, BAD и MMP9 (Zhen et al., 2014; Yao et al., 2015).

Избыточная экспрессия MAGED2 ассоциируется с меланомой, раком молочной железы и раком толстой кишки (Li et al., 2004; Strelakova et al., 2015).

Как было показано, уровень MET повышен при дедифференцированной липосаркоме и ассоциируется с меланоклеточными опухолями, гепатоклеточной карциномой, немелкоклеточным раком легких, наследственными формами папиллярного рака почек и аденокарциномами желудка (Petrini, 2015; Finocchiaro et al., 2015; Steinway et al., 2015; Bill et al., 2015; Yeh et al., 2015).

NAT8 ассоциируется с лимфобластным лейкозом (Mak et al., 2014).

NDRG1 является супрессором метастазов при раковых заболеваниях, таких как рак поджелудочной железы, и, как было показано, его уровень понижен при раке предстательной железы и раке толстой кишки, тогда как его уровень повышен при гепатоклеточной карциноме и аденокарциноме шейки матки (Nishio et al., 2008; Cheng et al., 2011; Bae et al., 2013; Richardson et al., 2013).

Как было продемонстрировано, уровень NLRC5 понижен в клеточных линиях опухоли, образованных из лимфоидных клеток (Stahli et al., 2012).

Уровень NPTX2 снижается за счет гиперметилирования промоторов при раке поджелудочной железы, саркоме Юинга и глиобластоме (Zhang et al., 2012b; Alholle et al., 2013; Shukla et al., 2013).

NQO2 ассоциируется с раком эндометрия, папиллярной микрокарциномой щитовидной железы и раком пищевода (Hevir-Kene and Rizner, 2015; Malik et al., 2012; Lee et al., 2013).

Уровень экспрессии OPN3 понижен в 5-фторурацил-резистентных клеточных линиях гепатоклеточной карциномы Bel7402 и HepG2 по сравнению с 5-фторурацил-чувствительными клетками Bel7402 и HepG2 (Jiao et al., 2012).

PDZD2 ассоциируется с нейроэндокринными опухолями тонкого кишечника и раком предстательной железы (Tam et al., 2006; Rehfeld et al., 2014).

Избыточная экспрессия PDZK1 может играть роль в развитии резистентности к лекарственным препаратам при множественной миеломе (RefSeq, 2002).

Как было продемонстрировано, уровень PFKFB3 повышен при раке желудка, раке толстой кишки, раке легких, раке молочной железы и ассоциируется с раком поджелудочной железы, раком предстательной железы и глиобластомой (Minchenko et al., 2014; Fleischer et al., 2011; Ragnum et al., 2013).

PLCB1 ассоциируется с первичной плоскоклеточной карциномой головы и шеи, миелоидным лейкозом и мультиформной глиобластомой (Guerrero-Preston et al., 2014; Waugh, 2014; Ramazzotti et al., 2011).

PLIN2 задействован в накоплении липидов и является плазменным биомаркером для выявления колоректального рака на ранних стадиях (Matsubara et al., 2011). Уровень PLIN2 значительно повышен у пациентов со светлоклеточной и папиллярной почечноклеточной карциномой в сравнении с пациентами контрольной группы. Концентрация PLIN2 в моче до операции отражает размер и стадию опухоли (Morrissey et al., 2014). Экспрессия PLIN2 значительно выше в образцах аденокарциномы легких, чем в нормальных тканях и тканях плоскоклеточных карцином легких (Zhang et al., 2014b).

Экспрессия PLOD1 ассоциируется с прогрессией рака молочной железы человека (Gilkes et al., 2013).

Уровень PRKCDBP, как было показано, понижен при развитии метастазов в головной мозг вследствие рака молочной железы и при первичном раке молочной железы. Кроме того, PRKCDBP ассоциируется с раком молочной железы, колоректальным раком, раком эндометрия, раком легких и раком желудка (Bai et al., 2012; Moutinho et al., 2014; Li et al., 2015; Tong et al., 2012; Wikman et al., 2012).

Как было показано, уровень RASGRP3 повышен при глиобластоме, раке молочной железы и меланоме человека и ассоциируется с раком предстательной железы, гепатоклеточной карциномой и раковыми опухолями полости рта (Nagy et al., 2014; Sowalsky et al., 2015; Lee et al., 2015; Yang et al., 2011; Bhatnagar et al., 2012; Martinez-Lopez et al., 2012).

RCN1 локализован в плазматической мембране в клеточных линиях рака эндотелия и рака предстательной железы человека (RefSeq, 2002). RCN1 экспрессируется в избытке при раке молочной железы (Amatschek et al., 2004).

REN ассоциируется с почечноклеточной карциномой, раком поджелудочной железы, десмопластической мелко-круглоклеточной опухолью и юкстагломерулярно-клеточной опухолью (Elouazzani et al., 2014; Lee et al., 2014; Nakai et al., 2015; Araujo et al., 2015).

Уровень RGS5, как было продемонстрировано, понижен при раке легких, повышен - при светлоклеточной почечноклеточной карциноме, гепатоклеточной карциноме, нескольких подтипах лимфомы и аденоме парашитовидной железы и ассоциируется с колоректальным раком, нейробластомой, раком яичника, немелкоклеточным раком легких и раком желудка (Volz et al., 2015; Xu et al., 2015; Wang et al., 2010a; Dannenmann et al., 2013; Koh et al., 2011; Huang et al., 2012b; Altman et al., 2012; Kumps et al., 2013; Sethakorn and Dulin, 2013; Hu et al., 2013).

RPGRIP1L подавляет свободный ["безъядерный"] рост отчасти за счет белка митотической контрольной точки Mad2 и является кандидатом в гены-супрессоры опухоли при гепатоклеточной карциноме человека (Lin et al., 2009).

Уровень RRAD, как было показано, понижен при раке легких, раке яичника и назофарингеальной карциноме и ассоциируется с мультиформной глиобластомой, плоскоклеточной карциномой пищевода и гепатоклеточной карциномой (Wang et al., 2014d; Yeom et al., 2014; Liu et al., 2015; Mo et al., 2012; Lin and

Chuang, 2012; Jin et al., 2013).

Как было продемонстрировано, уровень SEMA5B повышен при почечноклеточной карциноме, однако до сих пор его экспрессия не была обнаружена в других видах рака или нормальных тканях (Higota et al., 2006).

Уровень в плазме ингибиторного комплекса плазмин-альфа 2-плазмин, как было показано, является прогностическим фактором выживаемости при немелкоклеточной карциноме легких, а низкая активность альфа-2-антиплазмина наблюдалась в крови пациентов с карциномой предстательной железы (Taguchi et al., 1996; Zietek et al., 1996).

Экспрессия SLC16A3 ассоциировалась с неблагоприятным прогнозом у пациентов с гепатоклеточным раком и повышением клеточной пролиферации, миграции и инвазии в экспериментах с клеточными линиями (Gao et al., 2015a). Функциональное участие SLC16A3 в онкогенезе было продемонстрировано в подгруппе рака поджелудочной железы (Baek et al., 2014).

Как было показано, уровень SLC16A4 повышен при немелкоклеточном раке легких, аденокарциноме желез, протоковой аденокарциноме поджелудочной железы, плоскоклеточной карциноме и раке желудка и ассоциируется с раком молочной железы и гепатоклеточной карциномой (Baek et al., 2014; Gao et al., 2015a; Yan et al., 2014; Jensen et al., 2014; Koo and Yoon, 2015; Granja et al., 2015; Vaenke et al., 2015).

Высокий уровень экспрессии транспортера 2 органических анионов и транспортера 2 органических катионов является независимым прогностическим фактором благоприятного исхода у пациентов с метастатическим колоректальным раком, прошедших курс химиотерапии на основе препаратов FOLFOX (Tashiro et al., 2014). Уровень экспрессии мРНК SLC22A2, SLC22A11, SLC28A1, SLC28A3 и SLC29A1 был понижен в клетках опухолей поджелудочной железы при сравнении с неопластическими тканями поджелудочной железы (Mohelnikova-Duchonova et al., 2013a). SLC22A2 (также известный как OCT2) регулирует поглощение цисплатина в проксимальных трубочках, и ингибирование OCT2 защищает от серьезной нефротоксичности, вызванной цисплатином (Sprowl et al., 2013).

SLC47A1 ассоциируется с раком предстательной железы (Joerger et al., 2015).

Уровень экспрессии SLC6A13, как было показано, повышен при раке толстой кишки (Tran et al., 2014b).

Уровень SMYD2, как было продемонстрировано, повышен при плоскоклеточной первичной карциноме пищевода, раке молочной железы, раке печени, раке желудка и остром лимфобластном лейкозе (Sakamoto et al., 2014; Komatsu et al., 2015; Nguyen et al., 2015).

SYT9 ассоциируется с раком шейки матки и раком предстательной железы и может представлять собой потенциальный биомаркер рака шейки матки (Chen et al., 2014c; Bao et al., 2011).

Экспрессия TGFBI, как было показано, повышена при холангиокарциноме, карциноме печени, карциноме желудка, плоскоклеточной карциноме пищевода и светлоклеточной почечноклеточной карциноме. Кроме того, как было показано,

TGFBI ассоциируется с колоректальным раком (Lebdai et al., 2015; Ozawa et al., 2014; Zhu et al., 2015; Han et al., 2015).

THY1 является кандидатом в гены-супрессоры опухоли для носоглоточной карциномы, обладая антиинвазивной активностью (Lung et al., 2010).

Экспрессия белка TIMP1 ассоциируется с неблагоприятным прогнозом у пациентов с метастатической болезнью печени, острым лимфобластном лейкозе у детей и раке молочной железы (Bunatova et al., 2012; Scrideli et al., 2010; Sieuwerts et al., 2007). TIMP1 является потенциальным сывороточным маркером выявления рака поджелудочной железы (Slater et al., 2013). TIMP1 является хорошо известным маркером рака щитовидной железы (Griffith et al., 2006).

Как было показано, уровень TP11 понижен при остеосаркоме и ассоциируется с раком молочной железы, плоскоклеточной карциномой пищевода, глиобластомой, раком эндометрия и раком яичника (Zamani-Ahmadmahmudi et al., 2014; Chen et al., 2014a; Yoshida et al., 2013; Khan et al., 2013b; Gao et al., 2014).

Как было показано, уровень TRIP6 повышен при саркоме Юинга, назофарингеальной карциноме и глиобластоме и ассоциируется с раком молочной железы (Pavlikova et al., 2015; Lai et al., 2010; Fei et al., 2013; Grunewald et al., 2013).

Транскрипция UBE2QL1, как было показано, понижена при почечноклеточной карциноме (Wake et al., 2013).

UGDH ассоциируется с колоректальным раком, раком предстательной железы, серозной аденокарциномой яичника, раком молочной железы и гепатоклеточной карциномой (Lapointe and Labrie, 1999; Konno, 2001; Fan et al., 2009; Wei et al., 2009; Wang et al., 2010b).

Полиморфизмы гена VKORC1 могут ассоциироваться с риском развития рака предстательной железы (Nimptsch et al., 2009). VKORC1 влияет на концентрацию PIVKAP (белок, индуцируемый отсутствием витамина К), который используется для скрининга на гепатоклеточную карциному (Wang et al., 2010c).

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).

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

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

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

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

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

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

Частоты экспрессии (табл. 5) выведены из частот гаплотипа Gf среди американцев, приводимых в работе Morigi et al. (Morigi et al., 1997), с использованием формулы Харди-Вейнберга $F=1-(1-Gf)^2$. Комбинации A*02 или A*24 с определенными аллелями HLA-DR вследствие неравномерного распределения связей могут быть обогащенными или менее частыми, чем ожидается от их индивидуальных частот выявления. Более подробная информация представлена в работе Chanock et al. (Chanock et al., 2004).

Таблица 5

Частоты экспрессии F HLA-A*02 и HLA-A*24 и наиболее частых серологических видов HLA-DR

Аллель	Популяция	Рассчитанный фенотип по частоте аллеля
A*02	Европеоидная раса (Северная Америка)	49,1%
A*02	Афроамериканцы (Северная Америка)	34,1%
A*02	Монголоиды (Северная Америка)	43,2%
A*02	Латиноамериканцы (Северная Америка)	48,3%
DR1	Европеоидная раса (Северная Америка)	19,4%
DR2	Европеоидная раса (Северная Америка)	28,2%
DR3	Европеоидная раса (Северная Америка)	20,6%
DR4	Европеоидная раса (Северная Америка)	30,7%
DR5	Европеоидная раса (Северная Америка)	23,3%
DR6	Европеоидная раса (Северная Америка)	26,7%
DR7	Европеоидная раса (Северная Америка)	24,8%
DR8	Европеоидная раса (Северная Америка)	5,7%
DR9	Европеоидная раса (Северная Америка)	2,1%
DR1	Афроамериканцы (Северная Америка)	13,20%
DR2	Афроамериканцы (Северная Америка)	29,80%
DR3	Афроамериканцы (Северная Америка)	24,80%
DR4	Афроамериканцы (Северная Америка)	11,10%
DR5	Афроамериканцы (Северная Америка)	31,10%
DR6	Афроамериканцы (Северная Америка)	33,70%

DR7	Афроамериканцы (Северная Америка)	19,20%
DR8	Афроамериканцы (Северная Америка)	12,10%
DR9	Афроамериканцы (Северная Америка)	5,80%
DR1	Монголоиды (Северная Америка)	6,80%
DR2	Монголоиды (Северная Америка)	33,80%
DR3	Монголоиды (Северная Америка)	9,20%
DR4	Монголоиды (Северная Америка)	28,60%
DR5	Монголоиды (Северная Америка)	30,00%
DR6	Монголоиды (Северная Америка)	25,10%
DR7	Монголоиды (Северная Америка)	13,40%
DR8	Монголоиды (Северная Америка)	12,70%
DR9	Монголоиды (Северная Америка)	18,60%
DR1	Латиноамериканцы (Северная Америка)	15,30%
DR2	Латиноамериканцы (Северная Америка)	21,20%
DR3	Латиноамериканцы (Северная Америка)	15,20%
DR4	Латиноамериканцы (Северная Америка)	36,80%
DR5	Латиноамериканцы (Северная Америка)	20,00%
DR6	Латиноамериканцы (Северная Америка)	31,10%
DR7	Латиноамериканцы (Северная Америка)	20,20%
DR8	Латиноамериканцы (Северная Америка)	18,60%
DR9	Латиноамериканцы (Северная Америка)	2,10%
A*24	Филиппины	65%
A*24	Русские ненцы	61%
A*24:02	Япония	59%
A*24	Малайзия	58%
A*24:02	Филиппины	54%
A*24	Индия	47%
A*24	Южная Корея	40%
A*24	Шри-Ланка	37%
A*24	Китай	32%
A*24:02	Индия	29%
A*24	Западная Австралия	22%
A*24	США	22%
A*24	Россия, Самара	20%
A*24	Южная Америка	20%
A*24	Европа	18%

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).

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 двунитевую 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 (двунитевая 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 по существу в чистой форме, т.е. без контаминирующих эндогенных материалов и в количестве или с концентрацией, позволяющей идентификацию, манипуляцию и восстановление сегмента и его составных нуклеотидных последовательностей стандартными биохимическими методами, например, с использованием вектора для клонирования. Такие фрагменты предлагаются в форме открытой рамки считывания, не прерываемой внутренними нетранслированными 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 определенно рассматривается в изобретении. Более того, определенно 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 выровненного основания или аминокислоты в Сравниваемой последовательности; и
- (ii) каждая брешь в Контрольной последовательности; и
- (iii) каждое выровненное основание или аминокислота в Контрольной последовательности, которые отличаются от выровненного основания или аминокислоты в Сравниваемой последовательности, представляя собой различие; и
- (iv) выравнивание должно начинаться с позиции 1 выровненных последовательностей;

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

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

Как было упомянуто выше, в настоящем изобретении, таким образом, предложен пептид, включающий последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 114 или ее вариант, который на 88% гомологичен последовательностям с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 114, или их варианту, который индуцирует Т-клеточную перекрестную реакцию с указанным пептидом. Пептиды по изобретению обладают способностью связываться с молекулой главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) I класса или удлиненные версии упомянутых пептидов - с МНС II класса.

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

Специалист данной области будет в состоянии оценить, будут ли Т-клетки, индуцированные вариантом конкретного пептида, способны к перекрестной реакции с самим пептидом (Arrau 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: 114. Например, пептид может быть модифицирован таким образом, что он по меньшей мере сохранит, если не улучшит, способность взаимодействовать и связываться со связывающей бороздкой подходящей молекулы MHC, такой как HLA-A*02 или -DR, и, таким образом, он по меньшей мере сохранит, если не улучшит, способность связываться с ТКР активированных Т-клеток.

Данные Т-клетки могут затем вступать в перекрестную реакцию с клетками и уничтожать клетки, которые экспрессируют полипептид, который содержит природную аминокислотную последовательность родственного пептида, как определено в аспектах этого изобретения. По информации из научной литературы и банков данных (Rammensee et al., 1999; Godkin et al., 1997), конкретные позиции связывающихся с HLA пептидов являются типичными якорными остатками, формирующими центральную последовательность, подходящую к соединительному элементу рецептора HLA, который определяется полярными, электрофизическими, гидрофобными и пространственными свойствами полипептидных цепей, образующих связывающую бороздку. Так, специалист данной области будет в состоянии модифицировать аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 114, сохраняя известные якорные остатки, и будет в состоянии определить, сохранят ли такие варианты способность связываться с молекулами MHC I или II класса. Варианты по настоящему изобретению сохраняют способность связываться с ТКР активированных Т-клеток, которые могут впоследствии вступать в перекрестную реакцию и уничтожать клетки, экспрессирующие полипептид, который содержит природную аминокислотную последовательность родственного пептида, как определено в аспектах настоящего изобретения.

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

Консервативные замены определены в контексте настоящего описания как обмены внутри одной из последующих пяти групп:

- группа 1 - малые, алифатические, неполярные или слабополярные 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);
- группа 5 - крупные, ароматические остатки (Phe, Tyr, Trp).

Менее консервативные замены могут охватывать замену одной аминокислоты другой, имеющей похожие характеристики, но отличающейся в какой-то степени по размеру, как в случае замены аланина остатком изолейцина. Высоконеконсервативные 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 охватываемыми 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 более чем в одной позиции с получением пептида по существу с 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 настоящем документе, 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 другие аминокислоты, включение которых 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 6

Варианты и мотив пептида в соответствии
с SEQ ID NO: 1, 4 и 5

Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO: 1	A	L	I	V	S	L	P	Y	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: 4	F	L	S	Q	D	I	I	T	V
Вариант									I
									L
									A
		M							
		M							I
		M							L
		M							A
		A							
		A							I
		A							L
		A							A
		V							
		V							I
		V							L
		V							A
		T							
		T							I
		T							L
		T							A
		Q							
		Q							I
		Q							L
		Q							A
Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO: 5	Y	L	Y	P	N	L	T	R	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

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 табл. 7.

Таблица 7

Комбинации элонгаций пептидов по изобретению

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

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

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

В альтернативном варианте осуществления пептид удлинен с одной или с 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, 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 с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 114.

"Состоящий по существу из" подразумевает, что пептид в соответствии с настоящим изобретением, помимо последовательности в соответствии с любой из SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 114 или одним из их вариантов, содержит дополнительные находящиеся на N- и/или С-конце фрагменты аминокислот, которые не являются по существу формирующими часть пептида, которая функционирует как эпитоп для эпитопа 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 (p33, 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 или встроены в антитело, являющееся специфичным для дендритных клеток, описанных в настоящем документе.

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 ретрообратные пептидомиметики могут быть по-

лучены методами, известными из уровня техники, например, такими, как описано в работе Meziere et al. (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 et al. (Meziere et al., 1997) показывают, что эти псевдопептиды пригодны для связывания с МНС и индукции ответов Т-хелперных клеток. Ретрообратные пептиды, которые содержат связи NH-CO вместо пептидных связей CO-NH, намного более устойчивы к протеолизу.

Непептидной связью является, например, $-CH_2-NH$, $-CH_2S-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH=CH-$, $-COCH_2-$, $-CH(OH)CH_2-$ и $-CH_2SO-$. В патенте США № 4897445 предлагается метод твердофазного синтеза непептидных связей ($-CH_2-NH$) в полипептидных цепях, который включает полипептиды, синтезированные с использованием стандартной методики, и непептидную связь, синтезированную при реакции аминокальдегида и аминокислоты в присутствии $NaCNBH_3$.

Пептиды, включающие последовательности, описанные выше, могут быть синтезированы с дополнительными химическими группами, находящимися на их аминном и/или карбоксильном концах, для увеличения стабильности, биологической доступности и/или аффинности пептидов. Например, гидрофобные группы, такие как карбобензоксильные, данзилльные или трет-бутилоксикарбонильные группы, могут быть добавлены к аминным концам пептидов. Подобным образом, ацетильная группа или 9-флуоренилметокси-карбонильная группа может быть размещена на аминных концах пептидов. Кроме того, гидрофобная группа, трет-бутилоксикарбонильная или амидная группа могут быть добавлены 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, пиридоксирования лизина, восстановительного алкилирования, тринитробензилирования аминных групп 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислотой (TNBS), амидную модификацию карбоксильных групп и сульфгидрильную модификацию с помощью окисления надмуравьиной кислотой цистеина до цистеиновой кислоты, образование производных ртути, образование смешанных дисульфидов с другими тиоловыми соединениями, реакцию с малеимидом, карбоксиметилирование йодоуксусной кислотой или йодацетамидом и карбамоилирование цианатом при щелочном уровне pH, хотя не ограничиваясь ими. В этой связи специалист данной области может проконсультироваться с главой 15 в работе *Current Protocols In Protein Science*, Eds. Hassan et al. (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'-этилкарбодимид может использоваться для образования внутримолекулярных поперечных связей между остатком лизина и остатком глутаминовой кислоты. Например, диэтилпирикарбонат 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. 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 et al. (Lukas et al., 1981) и в прилагающихся ссылках. Временная защита N-аминогруппы производится 9-флуоренилметилоксикарбонильной (Fmoc) группой. Повторное расщепление этой высокощелочелюбильной защитной группы осуществляется при использовании 20% пиперидина в N,N-диметилформамиде. Функциональные группы боковой цепи могут быть защищены получением таких соединений, как их бутиловые эфиры (в случае серина, треонина и тирозина), бутиловые сложные эфиры (в случае глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты), бутилоксикарбонильное производное (в случае лизина и гистидина), тритильное производное (в случае цистеина) и производное 4-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфоната (в случае аргинина). Если глутамин или аспарагин являются C-терминальными остатками, для защиты амидогруппы боковой цепи используется 4,4'-диметоксибензгидрильная группа. Твердофазный носитель основан на полимере полидиметилакриламиде, состоящем из трех мономеров: диметилакриламида (каркасный мономер), бис-акрилоилэтилендиамина (компонент для перекрестной сшивки, линкер) и метилового эфира акрилоилсаркозина (функционализирующий агент). Для образования легкоотщепляемой связи пептида и смолы используется нестойкое к действию кислот производное 4-гидрокси-метилфеноксисульфоновой кислоты. Все аминокислотные производные добавляются в виде предварительно синтезированных симметричных ангидридных производных за исключением аспарагина и глутамина, которые добавляются с применением обратной реакции соединения, опосредованной N,N-дициклогексилкарбодимид/1-гидроксибензотриазолом. 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) обращенно-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), обращенно-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 презентуемых 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 результатов (Benjamini and Hochberg, 1995).

Для идентификации и относительной количественной оценки лигандов HLA с помощью масс-спектрометрического анализа молекулы HLA из подвергнутых шоковой заморозке образцов тканей были очищены и из них выделены HLA-ассоциированные пептиды. Выделенные пептиды были разделены и последовательности были идентифицированы с помощью методов жидкостной хроматографии и масс-

спектрометрии (LC-MS) с ионизацией электрораспылением (nanoESI) в режиме реального времени. Полученные пептидные последовательности подтверждали сравнением картины фрагментации природных пептидов TUMAP, записанной на образцах ПКК (N=18 *02-положительные образцы), 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 18 пациентов с ПКК.

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.

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 ткани ПКК были очищены, и HLA-ассоциированные пептиды были выделены и проанализированы методом ЖХ-МС (см. примеры). Все TUMAP, содержащиеся в настоящем документе, были идентифицированы с помощью этого подхода на образцах первичных опухолей ПКК, что подтверждает их презентацию на клетках первичных ПКК.

Пептиды TUMAP, идентифицированные на многочисленных образцах ПКК и нормальных тканей, были подвергнуты количественному анализу с помощью ЖХ/МС без 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® v2. позволяет проведение прямого абсолютного количественного определения уровня МНС-, предпочтительно HLA-рестриктированного, пептида на раковых или других пораженных заболеванием 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 10 экспериментов с введением стандартных добавок с тремя повторными измерениями для каждого (см. пример 6 и табл. 12).

В настоящем изобретении предложены пептиды, которые пригодны для лечения раковых заболеваний/опухолей, предпочтительно ПКК, клетки которых презентуют в избытке или исключительно пептиды по изобретению. Как показал масс-спектрометрический анализ, эти пептиды естественно презентуются молекулами HLA на образцах первичной ПКК человека.

Многие из исходных генов/белков (называемых также "белками полной длины" или "базовыми белками"), из которых были получены пептиды, были в высокой степени избыточно экспрессированы в клетках рака по сравнению с нормальными тканями - понятие "нормальные ткани" в связи с настоящим изобретением подразумевает здоровые клетки почек или другие нормальные клетки ткани, демонстрирующие 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 ткани пациента, страдающего ПКК, 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 ПКК, презентующие полученные пептиды.

Было показано, что пептиды по настоящему изобретению способны стимулировать Т-клеточные ответы и/или избыточно презентуются и поэтому могут использоваться для получения антител и/или ТКР, такие как растворимые ТКР, в соответствии с настоящим изобретением (см. примеры 3, 4). Кроме того, пептиды, если находятся в комплексе с соответствующей молекулой МНС, могут быть использованы для получения антител и/или ТКР, в частности растворимых ТКР, в соответствии с настоящим изобретением. Соответствующие способы хорошо известны специалисту данной области, а также могут быть найдены в соответствующих литературных источниках. 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 высокоспецифично направлен против опухолевых клеток, так как целевые пептиды по настоящему изобретению не презентуются на нормальных тканях в сравнимом количестве копий, предотвращая, тем самым, риск нежелательных аутоиммунных реакций против нормальных клеток у пациента.

Настоящее описание далее относится к Т-клеточным рецепторам (ТКР), включающим альфа-цепь и бета-цепь ("альфа/бета-ТКР"). Также предложены пептиды, способные связываться с ТКР и антителами, если они презентуются молекулой МНС. 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, причем 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 (ТМ) 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 до около 10 нМ; от около 10 до около 20 нМ; от около 20 до около 30 нМ; от около 30 до около 40 нМ; от около 40 до около 50 нМ; от около 50 до около 60 нМ; от около 60 до около 70 нМ; от около 70 до около 80 нМ; от около 80 до около 90 нМ и от около 90 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 формируют 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 могут быть связаны 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 быть конъюгированы с терапевтически активным ингредиентом, таким как радионуклид, химиотерапевтическим средством или токсином.

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

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

ционные системы *in vitro*. Синтезированные *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, фосфолипидат-киназой (PGK), β -актином, убиквитином и комбинированным промотором вируса обезьян 40 (SV40)/CD43, фактором элонгации (EF)-1a и промотором вируса некроза селезенки (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 (сРРТ), который способствует ядерной транслокации лентивирусных конструкций (Follenzi et al., 2000), и посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (wPRE), который повышает уровень экспрессии трансгена за счет увеличения стабильности РНК (Zufferey et al., 1999).

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

Для достижения высоких уровней экспрессии ТКР на поверхности требуется транскрипция высоких уровней как цепей ТКР-альфа, так и ТКР-бета, введенного ТКР. Для этого цепи ТКР-альфа и ТКР-бета согласно настоящему описанию могут быть клонированы в бицистронные конструкции в одном векторе, который, как было показано, способен преодолеть данное препятствие. Использование участка внутренней посадки рибосомы вируса (IRES) между цепями ТКР-альфа и ТКР-бета приводит к скоординированной экспрессии обеих цепей, поскольку цепи ТКР-альфа и ТКР-бета образуются из одного транскрипта, который разделяется на два белка во время 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 аутоиммуности. Например, формирование смешанных димеров ТКР может уменьшить число молекул CD3, имеющихся в наличии для формирования правильно спаренных комплексов ТКР и, таким образом, может существенно снизить функциональную авидность клеток, экспрессирующих введенный ТКР (Kuball et al., 2007).

Для снижения ошибочного спаривания С-концевой домен введенных цепей ТКР согласно настоящему описанию может быть модифицирован в целях стимуляции межцепочечной аффинности, при этом снижая способность введенных цепей спариваться с эндогенным ТКР. Данные стратегии могут включать замещение С-концевых доменов ТКР-альфа и ТКР-бета-цепей человека их мышинными эквивалентами (С-концевой "муринизированный" домен); получение второй межцепочечной дисульфидной связи в С-концевом домене за счет введения второго остатка цистеина в обе цепи: ТКР-альфа и ТКР-бета введенного ТКР (модификация цистеином); обмен взаимодействующими остатками в С-концевом домене ТКР-альфа и ТКР-бета-цепей ("выступ-во-впадину") и слияние вариабельных 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 рамках лечения. 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 $-NH_2$) 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 т.п., так и неорганические кислоты, например соляную кислоту, бромистоводородную кислоту, серную кислоту, азотную кислоту, фосфорную кислоту и т.п. 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 адьювантом (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 МНС 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: 114, и по меньшей мере один дополнительный пептид, предпочтительно от 2 до 50, более предпочтительно от 2 до 25, еще более предпочтительно от 2 до 20 и наиболее предпочтительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 пептидов. Пептид(ы) может(гут) быть получен(ы) из одного или более специфических ТАА и может(гут) связываться с молекулами МНС 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 двунитевыми; природными или стабилизированными формами полинуклеотидов, такими как, например, полинуклеотиды с фосфоротиоатным остовом, и может содержать или не содержать интроны при условии, что полинуклеотид кодирует пептид. Разумеется, только пептиды, которые содержат встречающиеся в природе аминокислотные остатки, присоединенные встречающимися в природе пептидными связями, могут кодироваться полинуклеотидом. 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 R.K. et al. (Saiki et al., 1988). Этот способ может быть использован для введения ДНК в подходящий вектор, например, при создании подходящих сайтов 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 № 4440859, 4530901, 4582800, 4677063, 4678751, 4704362, 4710463, 4757006, 4766075 и 4810648

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, желательна ли поддержка в эпизомальной 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 плазмид 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 селективируемые маркеры HIS3, TRP1, LEU2 и URA3. Плазмиды pRS413-416 являются дрожжевыми плазмидами с центромерами (Ycp). Основанные на промоторе CMV векторы (например, компании Sigma-Aldrich) обеспечивают кратковременную или устойчивую экспрессию, цитоплазмическую экспрессию или секрецию и N-терминальную или C-терминальную маркировку в различных комбинациях FLAG, 3xFLAG, c-тус или MAT. Данные слитые белки позволяют проводить выявление, очистку и анализ рекомбинантного белка. Слияния с двойной меткой обеспечивают гибкость при выявлении.

Сильный регуляторный участок промотора цитомегаловируса человека (CMV) повышает уровни конститутивной экспрессии белка, достигающие 1 мг/л в клетках COS. Для менее активных клеточных линий белковые уровни обычно составляют ~0,1 мг/л. Присутствие точки начала репликации SV40 будет приводить к высоким уровням репликации ДНК в перmissive 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 fl. Векторы, содержащие лидерную последовательность препротриспина (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 МНС I, так и МНС 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), Роквилл, Мэриленд, США (№ ATCC 31343)). Предпочтительные эукариотические клетки-хозяева включают дрожжи, клетки 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 et al. (Cohen et al., 1972) и (Green and Sambrook, 2012). Трансформация дрожжевых клеток описывается в работе Sherman et al. (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 кислотную фосфатазу (PAP), были одобрены Управлением по контролю за продуктами питания и лекарственными средствами США (FDA) 29 апреля 2010 г. для применения при лечении метастатического HRPC (гормон-рефрактерного рака предстательной железы), протекающего бессимптомно или с минимально выраженными симптомами (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 вклю-

чают п/к, в/к, в/б, в/м и в/в. Предпочтительные способы введения ДНК включают в/к, в/м, п/к, в/б и в/в. Вводятся могут, к примеру, дозы от 50 мкг до 1,5 мг, предпочтительно от 125 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 et al. (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 адьювантов. Адьюванты - это вещества, которые неспецифически усиливают или потенцируют иммунный ответ (например, иммунные ответы, опосредованные CD8-положительными Т-клетками или хелперными Т-клетками (T_H) на антиген, и могут, таким образом, рассматриваться как полезные в медикаменте по настоящему изобретению. Подходящие адьюванты включают, но без ограничения, 1018 ISS, соли алюминия, AMPLIVAX®, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, СуаА, 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 RepTel®, основанные на поли-(лактид когликолиде) [PLG] и декстране микрочастицы, талактоферрин SRL172, виросомы и другие вирусоподобные частицы, YF-17D, VEGF trap, R848, бета-глюкан, Pam3Cys, стимулон Aquila QS21, который получают из сапонина, микобактериальные экстракты и синтетические имитаторы бактериальных клеточных стенок и другие запатентованные адьюванты, такие как Detox компании Ribic, Quil или Superfos. Предпочтительными адьювантами являются такие, как адьювант Фрейнда или ГМ-КСФ. Несколько иммунологических адьювантов (например, MF59), специфических для дендритных клеток, и их получение были описаны ранее (Allison and Krummel, 1995). Также могут использоваться цитокины. Несколько цитокинов были непосредственно соотносены с влиянием на миграцию дендритных клеток к лимфоидным тканям (например, TNF- β), ускоряя созревание дендритных клеток до эффективных, презентующих антиген Т-лимфоцитам, клеток (например, ГМ-КСФ, ИЛ-1 и ИЛ-4) (патент США № 5849589, специально включенный в описание в полном объеме путем ссылки) и действуя как иммуноадьюванты (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 адьювантов 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 антигенспецифичные 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 T_H1 и интенсивной выработке цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) даже при отсутствии помощи со стороны CD4 Т-клеток. Активация T_H1 , вызванная стимуляцией TLR9, сохраняется даже в присутствии вакцинных адьювантов, таких как квасцы или неполный адьювант Фрейнда (IFA), которые обычно способствуют активации T_H2 . CpG-олигонуклеотиды проявляют даже большую адьювантную активность, если они входят в состав или вводятся в организм вместе с другими адьювантами 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 № 6406705 В1 описывается комбинированное применение CpG-олигонуклеотидов, адьювантов, не включающих нуклеиновые кислоты,

и антигена для вызывания антигенспецифического иммунного ответа. Антагонистом CpG TLR9 является dsSLIM (иммуномодулятор со структурой типа двухвощечный 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, TGF-бета, рецептору TNF-альфа) и SC58175, которые могут действовать терапевтически и/или как адъюванты. Количества и концентрации адъювантов и добавок, пригодных для использования в контексте настоящего изобретения, могут быть легко определены опытным специалистом без проведения излишних экспериментов.

Предпочтительными адъювантами являются анти-CD40, 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 вирусомы.

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, внутривенное, внутримышечное или для перорального введения. Для этого пептиды и, факультативно, другие молекулы растворяют или суспендируют в фармацевтически приемлемом, предпочтительно водном, носителе. Помимо того, композиция может содержать вспомогательные вещества, такие как буферы, связующие агенты, балластные вещества, разбавители, ароматизаторы, смазочные вещества и т.д. Пептиды могут быть также введены 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 EP 2112253.

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) антигенсвязывающий элемент) к сайту-мишени, например, к конкретному виду опухолевых клеток или стромы опухоли, несущих антиген-

ную 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 молекулой 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 дальнейшей 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: 114, 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, 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 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 нМ, с комплексом, который также называется "специфическим" в контексте настоящего изобретения.

Настоящее изобретение относится к пептиду, включающему последовательность, которая выбирается из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 114 или их варианта, который по меньшей мере на 88% гомологичен (предпочтительно, если он идентичен) последовательности с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO: 114 или их варианту, который индуцирует Т-клеточную перекрестную реакцию с указанным пептидом, где указанный пептид не является базовым полипептидом полной длины.

Настоящее изобретение далее относится к пептиду, включающему последовательность, которая выбирается из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 114 или их варианта, который по меньшей мере на 88% гомологичен (предпочтительно, если он идентичен) SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 114, 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: 114.

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 (N), 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 ПКК.

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: 114 или указанную вариантную аминокислотную последовательность.

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

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

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

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

Настоящее изобретение далее относится к применению в соответствии с изобретением, где указанные раковые клетки являются клетками ПКК или других солидных или гематологических опухолей, такими как клетки рака легких, рака головного мозга, рака желудка, рака толстой кишки или прямой кишки, рака печени, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, лейкозов, рака молочной железы, меланомы, рака яичника и рака пищевода.

Настоящее изобретение далее относится к конкретным белкам-маркерам и биомаркерам, основанным на пептидах в соответствии с настоящим изобретением, в контексте изобретения называемые "мишенями", которые могут быть использованы при постановке диагноза и/или составлении прогноза течения ПКК. 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 ПКК, доставляют токсин к клетке ПКК, экспрессирующей раковый ген-маркер на повышенном уровне и/или ингибируют активность полипептидного маркера ПКК) 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. Специалисту будет понятно, что для генерирования антител по изобретению могут использоваться либо полипептидные-маркеры ПКК полной длины, либо 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: 114, полипептид или вариант или его фрагмент может быть экспрессирована в прокариотических клетках (например, бактерий) или эукариотических клетках (например, дрожжей, насекомых или клетках млекопитающих), после чего рекомбинантный бе-

лок может быть очищен и использован в получении препарата из моноклональных или поликлональных антител, которые специфически связываются с полипептидным маркером ПКК, 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 клиническими методами анализа.

Понятие "моноклональное антитело" в контексте настоящего изобретения обозначает антитело, полученное, по существу, из 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 № 4816567, который включен в настоящее описание в полном объеме).

Моноклональные антитела по изобретению могут быть получены при использовании гибридомного метода. В рамках гибридомного 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 № 4816567. 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 мышинных 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 № 4342566. Расщепление антител под воздействием папаина обычно приводит к двум идентичным фрагментам, связывающимся с антигеном и называемым Fab-фрагментами, каждый из которых имеет отдельный антигенсвязывающий 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 антигенсвязывающие субпоследовательности антител), которые содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого иммуноглобулина. Гуманизированные антитела включают человеческие иммуноглобулины (антитело-реципиент), в которых остатки из определяющего комплементарность уча-

стка (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 № 4816567), где существенно меньшая часть, чем один интактный человеческий переменный домен, была заменена соответствующей последовательностью нечеловеческого вида. На практике гуманизированные антитела являются обычно человеческими антителами, в которых некоторые остатки CDR и, возможно, остатки FR заменены на остатки аналогичных сайтов антител грызунов.

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

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

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

Эффективная дозировка и режим введения антител могут быть определены эмпирически, а принятие таковых решений под силу специалисту данной области. Специалистам данной области будет понятно, что дозировка антител, которые должны быть введены, будет варьироваться в зависимости от, например, субъекта, которому будет вводиться антитело, способа введения, конкретного типа используемого антитела и других вводимых медикаментов. Типичная дневная дозировка антитела, используемого отдельно, может варьироваться от около 1 вплоть до 100 мг/кг массы тела или более в день, в зависимости от факторов, упоминаемых выше. После введения антитела, предпочтительно для лечения ПКК, эффективность терапевтического антитела может быть оценена различными способами, хорошо известными опытному специалисту. 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. Дополнительные способы получения описаны в патентной заявке WO 2013/057586A1.

В другом аспекте изобретения предложен ТКР, например, растворимый Т-клеточный рецептор (рТКР), распознающий конкретный комплекс пептида и МНС, раскрытый в контексте настоящего изобретения.

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.

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

Антитела для диагностических целей могут помечаться зондами, подходящими для обнаружения различными способами визуализации. Способы обнаружения зондов включают, но без ограничения, флуоресценцию, световую, конфокальную и электронную микроскопию; магнитно-резонансную томографию и спектроскопию; флуороскопию, компьютерную томографию и позитронно-эмиссионную томографию. Подходящие зонды включают, но без ограничения, флуоресцеин, родамин, эозин и другие флуорофоры, радиоизотопы, золото, гадолиний и другие лантаноиды, парамагнитное железо, фтор-18 и другие позитронно-активные радионуклиды. Более того, зонды могут быть би- или мультифункциональными и обнаруживаться более чем одним из приведенных способов. Данные антитела могут быть помечены напрямую или опосредованно указанными зондами. Присоединение зондов к антителам включает ковалентное присоединение зонда, внедрение зонда в антитело и ковалентное присоединение хелатирующего соединения для присоединения зонда, среди других широко признанных методов в данной области. Для иммуногистохимических исследований образец пораженной ткани может быть свежим или замороженным или может быть залит парафином и зафиксирован таким консервантом как формалин. 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 антигенспецифическим образом Т-клетки, где антиген является пептидом в соответствии с изобретением. Предпочтительно, если с антигенпрезентирующей клеткой применяется достаточное количество антигена.

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

Линия человеческих клеток с недостаточностью T2, на которые загружаются пептиды, имеется в наличии в Американской коллекции типовых культур, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, США под каталожным номером CRL 1992; клеточная линия дрозодилы, линия Schneider 2 имеется в наличии в ATCC под каталожным номером CRL 19863; клеточная линия мыши RMA-S описывается в работе Ljunggren et al. (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: 114 и/или SEQ ID NO: 115 по SEQ ID NO: 151 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 et al. (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 et al. (Walter et al., 2003) описывают прайминг Т-клеток *in vitro* с использованием искусственных антигенпрезентирующих клеток (иАПК), что является также подходящим способом получения Т-клеток против выбранного пептида. В настоящем изобретении иАПК были получены прикреплением предварительно образованных комплексов МНС-пептид к поверхности полистироловых частиц (микросфер) с помощью биохимического способа с биотином-стрептавидином.

Данная система допускает точный контроль плотности МНС на иАПК, который позволяет селективно вызвать высоко- или низкоавидные антигенспецифические Т-клеточные ответы с высокой эффективностью в образцах крови. Кроме комплексов МНС-пептид, иАПК должны нести другие белки с ко-стимуляторной 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 в описание путем ссылки. Например, кроме клеток дрозифилы и Т2-клеток, для презентации антигенов могут использоваться другие клетки, такие как клетки яичника китайского хомяка (СНО), бакуловирус-инфицированные клетки насекомых, бактерии, дрожжи и инфицированные осповакциной клетки-мишени. Кроме того, могут быть использованы растительные вирусы (см., например, работу Porta et al. (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: 114.

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 aberrантно экспрессируют полипептид, включающий аминокислотную последовательность по изобретению, где пациенту вводится эффективное число активированных Т-клеток. Т-клетки, которые введены пациенту, могут быть получены от пациента и активироваться, как описывалось выше (т.е. они являются аутологичными Т-клетками). Альтернативно, Т-клетки получают не от пациента, а от другого индивида. Разумеется, предпочтительно, если индивид является здоровым индивидом. 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 aberrантно экспрессируют полипептид, включающий аминокислотную последовательность по изобретению, причем способ включает введение пациенту эффективного числа Т-клеток, как определено выше.

Под понятием "aberrантно экспрессированный" авторы изобретения подразумевают также, что полипептид экспрессирован в избытке по сравнению с нормальными уровнями экспрессии или что ген является "молчащим" в ткани, из которой образовалась опухоль, однако он экспрессирован в опухоли. Под понятием "экспрессирован в избытке" авторы изобретения понимают, что полипептид представлен на уровне, который по меньшей мере в 1,2 раза выше уровня, представленного в нормальной ткани; пред-

почтительно 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 также хорошо известны из уровня техники. С обзорами можно ознакомиться в работах Gattioni et al. и Morgan et al. (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, которая описана выше, в виде раствора или в лиофилизированной форме;

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

(в) факультативно, инструкции по (i) применению раствора или (ii) восстановлению раствора и/или по применению лиофилизированного состава.

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

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

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

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

Комплекты по настоящему изобретению могут включать один контейнер, который содержит лекарственную форму фармацевтических композиций 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 ПКК, медикамент по изобретению предпочтительно используется для лечения ПКК.

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 ПКК с различными HLA-A, HLA-B и HLA-C-аллелями. Оно может содержать пептиды, связанные с молекулами MHC I класса и MHC II класса, или удлиненные пептиды, связанные с молекулами MHC I класса. Помимо опухолеассоциированных пептидов, собранных из нескольких тканей ПКК, хранилище может содержать маркерные пептиды, связанные с HLA-A*02 и HLA-A*24. Эти пептиды позволяют произвести количественное сравнение интенсивности Т-клеточного иммунного ответа, индуцированного пептидами TUMAP, и, следовательно, позволяют сделать важный вывод о способности вакцины вызывать противоопухолевые ответы. Во-вторых, 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 заключение 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 ПКК 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 (ПКК) по сравнению с рядом нормальных органов и тканей применяли анализ экспрессии информационной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) всего генома.

3. Идентифицированные HLA-лиганды сравнивали с данными по экспрессии генов. Пептиды, презентуемые в избытке или селективно презентуемые 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 ПКК.

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, презентующими 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 опухолях пациентов и, где это возможно, проявляют сильную иммуногенность *in vitro* при анализе с индивидуальными МКПК пациента.

Предпочтительно, чтобы пептиды, включенные в вакцину, были идентифицированы способом, включающим (а) идентификацию опухолеассоциированных пептидов (TUMAP), презентуемых опухолевым образцом отдельного пациента; (б) сравнение идентифицированных на этапе (а) пептидов с хранилищем (банком данных) пептидов, как описано выше; и (в) выбор по меньшей мере одного пептида из хранилища (банка данных), который коррелирует с опухолеассоциированным пептидом, идентифицированным у пациента. Например, пептиды TUMAP, презентуемые опухолевым образцом, идентифицируют с помощью (а1) сравнения данных по экспрессии в опухолевом образце с данными нормальной ткани, соответствующей типу ткани опухолевого образца, для идентификации белков, которые в опухолевом образце экспрессируются в избытке или аберрантно; и (а2) установления корреляции между данными экспрессии и последовательностями лигандов МНС, связанных с молекулами МНС I и/или II класса в опухолевом образце, в целях идентификации лигандов МНС, которые получены из белков, избыточно или аберрантно экспрессируемых опухолью. Предпочтительно, если последовательности лигандов МНС идентифицируются с помощью элюирования связанных пептидов из молекул МНС, выделенных из опухолевого образца, и секвенирования элюированных лигандов. Предпочтительно, если опухолевый образец и нормальная ткань получены от одного и того же пациента.

Помимо этого или в качестве альтернативы этому, при выборе пептидов с использованием 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 (а1) сравнения данных по экспрессии в опухолевом образце с данными нормальной ткани, соответствующей типу ткани опухолевого образца, для идентификации белков, которые в опухолевом образце экспрессируются в избытке или аберрантно; и (а2) установления корреляции между данными экспрессии и последовательностями лигандов МНС, связанных с молекулами МНС I и/или II класса в опухолевом образце, в целях идентификации лигандов МНС, которые получены из белков, избыточно или аберрантно экспрессируемых опухолью. В качестве другого примера могут быть идентифицированы белки, имеющие мутации, являющиеся уникальными для опухолевого образца, соответствующей нормальной ткани 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,

затем 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. Опухольеспецифические 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 (приблизительно 400 мкг на пептид) будут вводить с помощью внутривенной 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 ПЖК 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, может дать патоморфологу свидетельства того, что образец ткани является злокачественной, или воспаленной, или пораженной заболеванием вообще, или же может использоваться в качестве биомаркера ПЖК. 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 исследований 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 фиг. 1A-1N представлена избыточная презентация различных пептидов на нормальных тканях и на образцах ПКК.

Фиг. 1A - ген: SLC17A3, пептид: ALIVSLPYL (SEQ ID NO: 1) - ткани слева направо: 1 жировая ткань, 3 надпочечные железы, 2 артерии, 3 костных мозга, 7 головных мозгов, 3 молочной железы, 13 толстых кишок, 1 яичник, 1 двенадцатиперстная кишка, 4 пищевода, 2 желчных пузыря, 3 сердца, 4 образца лейкоцитов, 19 печеней, 43 легких, 1 лимфатический узел, 1 яичник, 6 поджелудочных желез, 2 периферических нерва, 1 брюшина, 1 гипофиз, 3 плевры, 1 предстательная железа, 6 прямых кишок, 3 скелетные мышцы, 3 образца кожи, 2 тонких кишки, 4 селезенки, 5 желудков, 1 семенник, 2 вилочковые железы, 3 щитовидные железы, 2 матки, 2 вены, 12 почек, 18 ПКК. Пептид также был обнаружен на клетках рака печени (не показано).

Фиг. 1B - ген: SOGA2, пептид: YLEEDVYQL (SEQ ID NO: 128) - ткани слева направо: 1 жировая ткань, 3 надпочечные железы, 2 артерии, 3 костных мозга, 7 головных мозгов, 3 молочной железы, 13 толстых кишок, 1 яичник, 1 двенадцатиперстная кишка, 4 пищевода, 2 желчных пузыря, 3 сердца, 4 образца лейкоцитов, 19 печеней, 43 легких, 1 лимфатический узел, 1 яичник, 6 поджелудочных желез, 2 периферических нерва, 1 брюшина, 1 гипофиз, 3 плевры, 1 предстательная железа, 6 прямых кишок, 3 скелетные мышцы, 3 образца кожи, 2 тонких кишки, 4 селезенки, 5 желудков, 1 семенник, 2 вилочковые железы, 3 щитовидные железы, 2 матки, 2 вены, 12 почек, 18 ПКК. Этот пептид также был обнаружен на клетках рака поджелудочной железы, рака яичника, рака желудка и рака легких (не показано).

Фиг. 1C - ген: SEMA5B, пептид: ALDPSGNQLI (SEQ ID NO: 12) - ткани слева направо: 1 жировая ткань, 3 надпочечные железы, 2 артерии, 3 костных мозга, 7 головных мозгов, 3 молочной железы, 13 толстых кишок, 1 яичник, 1 двенадцатиперстная кишка, 4 пищевода, 2 желчных пузыря, 3 сердца, 4 образца лейкоцитов, 19 печеней, 43 легких, 1 лимфатический узел, 1 яичник, 6 поджелудочных желез, 2 периферических нерва, 1 брюшина, 1 гипофиз, 3 плевры, 1 предстательная железа, 6 прямых кишок, 3 скелетные мышцы, 3 образца кожи, 2 тонких кишки, 4 селезенки, 5 желудков, 1 семенник, 2 вилочковые железы, 3 щитовидные железы, 2 матки, 2 вены, 12 почек, 18 ПКК. Этот пептид также был обнаружен на клетках рака яичника, рака головного мозга и рака легких (не показано).

Фиг. 1D - ген: RGS5, пептид: GLASFKSFL (SEQ ID NO: 8) - ткани слева направо: 1 жировая ткань, 3 надпочечные железы, 2 артерии, 3 костных мозга, 7 головных мозгов, 3 молочной железы, 13 толстых кишок, 1 яичник, 1 двенадцатиперстная кишка, 4 пищевода, 2 желчных пузыря, 3 сердца, 4 образца лейкоцитов, 19 печеней, 43 легких, 1 лимфатический узел, 1 яичник, 6 поджелудочных желез, 2 периферических нерва, 1 брюшина, 1 гипофиз, 3 плевры, 1 предстательная железа, 6 прямых кишок, 3 скелетные мышцы, 3 образца кожи, 2 тонких кишки, 4 селезенки, 5 желудков, 1 семенник, 2 вилочковые железы, 3 щитовидные железы, 2 матки, 2 вены, 12 почек, 18 ПКК. Этот пептид также был обнаружен на клетках рака предстательной железы, молочной железы, рака толстой кишки, рака печени, меланомы, рака яичника, пищевода, поджелудочной железы, головного мозга, желудка и легких (не показано).

Фиг. 1E - ген: SLC16A3, пептид: VVDEGPTGV (SEQ ID NO: 135) - ткани слева направо: 1 клеточная линия лейкоцитов, 5 нормальных тканей (3 легких, 1 лимфатический узел, 1 селезенка), 77 раковых тканей (2 рака головного мозга, 1 рак молочной железы, 1 рак толстой кишки, 1 рак пищевода, 10 раков почек, 1 лейкоз, 1 рак печени, 35 раков легких, 12 раков яичника, 8 раков поджелудочной железы, 5 раков желудка). Образцы без презентации пептида не показаны. Панель исследованных нормальных (здоровых) тканей была такой же как и для фиг. 1A-D.

Фиг. 1F - ген: ESM1, пептид: LLVPAHLVAA (SEQ ID NO: 25) - ткани слева направо: 1 жировая ткань, 3 адпочечные железы, 2 артерии, 3 костных мозга, 7 головных мозгов, 3 молочных железы, 13 толстых кишок, 1 двенадцатиперстная кишка, 4 пищевода, 2 желчных пузыря, 3 сердца, 4 образца лейкоцитов, 19 печеней, 43 легких, 1 лимфатический узел, 1 яичник, 6 поджелудочных желез, 2 периферических нерва, 1 брюшина, 1 гипофиз, 3 плевры, 1 предстательная железа, 6 прямых кишок, 3 скелетные мышцы, 3 образца кожи, 2 тонких кишки, 4 селезенки, 5 желудков, 1 семенник, 2 вилочковые железы, 3 щитовидные железы, 2 матки, 2 вены, 12 почек, 18 ПКК. Этот пептид также был обнаружен на клетках рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака головного мозга, рака легких и рака матки (не показано).

Фиг. 1G - ген: ARHGAP42, пептид: ILIKHLVKV (SEQ ID NO: 15) - ткани слева направо: 1 клеточная линия (1 меланома), 17 раковых тканей (1 рак толстой кишки, 5 раков почек, 1 рак печени, 3 рака легких, 4 рака лимфатических узлов, 1 рак яичка, 2 рака матки).

Фиг. 1H - ген: HTR, пептид: FIADVVEKI (SEQ ID NO: 33) - ткани слева направо: 16 раковых тканей (1 рак головного мозга, 1 рак молочной железы, 1 рак пищевода, 3 рака почек, 1 лейкоцитарный лейкоз, 5 раков легких, 1 рак лимфатических узлов, 2 рака яичника, 1 рак поджелудочной железы).

Фиг. 1I - ген: HSF2B, пептид: VLLDTILQL (SEQ ID NO: 38) - ткани слева направо: 1 доброкачествен-

венная ткань (рак почек), 3 клеточные линии (1 поджелудочная железа, 1 плевра, 1 предстательная железа), 1 другое заболевание (1 кожа), 9 нормальных тканей (1 легкое, 1 лимфатический узел, 2 плаценты, 1 тонкая кишка, 3 селезенки, 1 щитовидная железа), 67 раковых тканей (1 рак желчных протоков, 5 раков головного мозга, 2 рака молочной железы, 2 рака пищевода, 2 рака желчного пузыря, 4 рака почек, 7 лейкоцитарных лейкозов, 3 рака печени, 16 раков легких, 5 раков лимфатических узлов, 1 рак миелоидных клеток, 9 раков яичника, 1 рак поджелудочной железы, 1 рак прямой кишки, 5 раков кожи, 2 рака мочевого пузыря, 1 рак матки).

Фиг. 1J - ген: TRAM1, пептид: YLLNHLGL (SEQ ID NO: 39) - ткани слева направо: 2 клеточные линии (1 почка, 1 поджелудочная железа), 1 нормальная ткань (1 легкое), 19 раковых тканей (1 рак молочной железы, 2 рака почек, 3 лейкоцитарных лейкоза, 2 рака печени, 7 раков легких, 1 рак лимфатических узлов, 1 рак яичника, 1 рак прямой кишки, 1 рак мочевого пузыря).

Фиг. 1K - ген: PXDNL, пептид: SILDAVQRV (SEQ ID NO: 52) - ткани слева направо: 23 раковые ткани (3 рака головного мозга, 4 рака молочной железы, 3 рака почек, 8 раков легких, 2 рака яичника, 1 рак поджелудочной железы, 1 рак кожи, 1 рак матки).

Фиг. 1L - ген: THY1, пептид: SLLQATDFMSL (SEQ ID NO: 82) - ткани слева направо: 11 клеточных линий (11 клеточных линий поджелудочной железы), 4 нормальные ткани (1 почка, 1 лимфатический узел, 1 плацента, 1 трахея), 36 раковых тканей (1 рак желчных протоков, 5 раков головного мозга, 3 рака молочной железы, 4 рака толстой кишки, 1 рак пищевода, 3 рака почек, 1 рак печени, 9 раков легких, 1 рак лимфатических узлов, 1 рак яичника, 2 рака поджелудочной железы, 1 рак прямой кишки, 2 рака кожи, 1 рак мочевого пузыря, 1 рак матки).

Фиг. 1M - ген: ARRDC3, пептид: KIPVSPSI (SEQ ID NO: 98) - ткани слева направо: 2 клеточные линии (2 почки), 4 нормальные ткани (1 надпочечная железа, 1 легкое, 1 лимфатический узел, 1 плацента), 47 раковых тканей (4 рака головного мозга, 1 рак молочной железы, 1 рак пищевода, 1 рак желчного пузыря, 5 раков почек, 1 лейкоцитарный лейкоз, 5 раков печени, 12 раков легких, 2 рака лимфатических узлов, 4 рака яичника, 3 рака предстательной железы, 2 рака кожи, 6 раков матки).

Фиг. 1N - ген: TIMP1, пептид: KLQDGLLHI (SEQ ID NO: 103) - ткани слева направо: 1 клеточная линия (1 линия клеток крови), 29 раковых тканей (2 рака головного мозга, 5 раков толстой кишки, 3 рака почек, 1 рак печени, 4 рака легких, 2 рака лимфатических узлов, 3 рака яичника, 1 рак поджелудочной железы, 1 рак прямой кишки, 6 раков кожи, 1 рак яичка).

На фиг. 2A-2D представлены примеры профилей экспрессии (относительная экспрессия в сравнении с нормальной почкой) исходных генов настоящего изобретения, которые в высокой степени экспрессированы в избытке или исключительно экспрессированы в ПКК в панели образцов нормальных тканей и 35 образцах ПКК. Ткани слева направо: надпочечная железа, артерия, костный мозг, головной мозг (целиком), молочная железа, толстая кишка, пищевод, сердце, почка (три повторных измерения), лейкоциты, печень, легкие, лимфатический узел, яичник, поджелудочная железа, плацента, предстательная железа, слюнная железа, скелетная мышца, кожа, тонкая кишка, селезенка, желудок, семенник, вилочковая железа, щитовидная железа, мочевого пузыря, шейка матки, матка, вена, 23 образца нормальных почек, 35 образцов ПКК.

Фиг. 2A - GAL3ST1.

Фиг. 2B - EGLN3.

Фиг. 2C - APOL1.

Фиг. 2D - MET.

На фиг. 3A-F показаны типичные данные по иммуногенности: результаты проточного цитометрического анализа после пептид-специфического окрашивания мультимеров в качестве результатов CD8⁺ Т-клеточных ответов *in vitro* здорового HLA-A*02+ донора. CD8⁺ Т-клетки примировали с помощью искусственных АПК, стимулированных моноклиальными антителами к CD28 и HLA-A*02 в комплексе с пептидом с последовательностью SEQ ID NO: 20 (С, левая секция), пептидом с последовательностью SEQ ID NO: 34 (D, левая панель), пептидом с последовательностью SEQ ID NO: 1 (Е, левая панель) или пептидом с последовательностью SEQ ID NO: 15 (F, левая панель), соответственно. После трех циклов стимуляции обнаружение клеток, реагирующих с пептидом, производилось с помощью двойного окрашивания мультимеров, используя A*02/SEQ ID NO: 20 (С), A*02/SEQ ID NO: 34 (D), A*02/SEQ ID NO: 1 (Е) или A*02/SEQ ID NO: 15 (F). Правые секции (С, D, Е и F) 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 + клеток среди CD8⁺ лимфоцитов.

Примеры

Пример 1.

Идентификация и количественное определение опухолеассоциированных пептидов, презентуемых на поверхности клетки.

Образцы тканей.

Опухолевые ткани пациентов были получены из компании BioServe (Белтсвилль, Мэриленд, США); Университетской клиники г. Мюнхена; Медицинского университета префектуры Киото (KUM); Университетской клиники г. Тюбинген.

Нормальные (здоровые) ткани были получены из компаний Bio-Options Inc., Калифорния, США; BioServe, Белтсвилль, Мэриленд, США; Capital BioScience Inc., Роквилль, Мэриленд, США; Geneticist Inc., Глендейл, Калифорния, США; Университетской клиники г. Женева; Университетской клиники г. Гейдельберг; Медицинского университета префектуры Киото (KUM); Университетской клиники г. Мюнхена; компании ProteoGenex Inc., Кальвер-Сити, Калифорния, США; Университетской клиники г. Тюбинген.

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 или HLA-A, -B, -C-специфического антитела W6/32, 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 плавленого кварца (75 мкм в/д \times 250 мм) с обращенно-фазовым сорбентом 1,7 мкм C18 (Waters) с применением скорости потока в 400 нл/мин. Затем пептиды разделяли с использованием двухэтапного 180-минутного бинарного градиента от 10 до 33% растворителя В при скорости потока 300 нл/мин. Для создания градиента использовали растворитель А (0,1% муравьиной кислоты в воде) и растворитель В (0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле). Позолоченный стеклянный капилляр (PicoTip, New Objective) использовали для введения в источник нано-ESI. 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 ($R=30000$), затем следовало сканирование MS/MS также на Orbitrap ($R=7500$) на пяти особенно многочисленных ионах-предшественниках с динамическим исключением отобранных ранее ионов. Tandемные масс-спектры интерпретировали при помощи программы SEQUEST с дополнительным контролем вручную. Идентифицированную пептидную последовательность 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 взаимосогласованности 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 ПКК с фоновым уровнем образцов нормальной ткани. Профили презентации типичных пептидов, презентуемых в избытке, показаны на фиг. 1. Показатели презентации отдельных пептидов показаны в табл. 8.

Показатели презентации. В табл. 8 представлены пептиды, которые в очень высокой степени избыточно презентуются на опухолях в сравнении с панелью нормальных тканей (+++), в высокой степени

избыточно презентирются на опухолях в сравнении с панелью нормальных тканей (++) или избыточно презентирются на опухолях в сравнении с панелью нормальных тканей (+).

Таблица 8

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептида
1	ALIVSLPYL	+++
2	ILWREVVTL	+++
3	RLLGEVQAL	+++
4	FLSQDIITV	+++
5	YLYPNLTRL	+++
6	VLFELSKTV	+++
7	FLLSLIDRL	+++
8	GLASFKSFL	+++
9	ILLQKPDSV	+++
10	KLLQNNYGL	+
11	FIQTEAPKEV	+++
12	ALDPSTGNQLI	+++
13	KIMAQILTV	+
14	ALLTETIFL	++
15	ILIKHLVKV	+++
16	FMPEELPQL	+++

037050

17	ILAQQVHAL	+++
18	YVLDLAAKV	+++
19	LLDPGSLQL	+
20	AVANTTFTV	+++
21	RLIQGDQILSV	+++
23	YIQEVVQYI	+++
24	FTLGTTVFL	++
26	SLMEILYTL	+++
27	SLSDLLVSL	++
28	FIADLVVGL	++
29	ILLDLEQAL	+
30	QLFYTKIFL	++
31	VLFGLDPAVIKV	+
32	FLAGGIRGSGA	+++
33	FIADVVEKI	+++
34	ELNNQNFYL	+++
35	VLHSLQTQL	+++
36	SLFGKKYIL	+++
37	VLAPVILML	+++
38	VLLDTILQL	+++
39	YLLNLNHLGL	+++
40	YIQEHLQI	++
41	GLLKTQLKL	+
42	VILDTGTIQL	+++
43	YLKDELDEL	+++
44	ALFSFVTAL	+
45	ALLGIPLTL	++
47	TLAEVRVQEI	+
48	VVASNIMEV	+++
49	VLIVEVPGV	+++
50	SLSDHIVLL	+

037050

51	NLWPMITL	+++
52	SILDAVQRV	+++
55	YLALILPVL	+++
56	ILMDFSNSM	+
57	SLQKEILYL	+++
58	FLVDFEQSHL	++
60	ILWKDIEYV	+++
61	SLMGILLRI	+++
62	VLGPAFLVQL	+++
66	TLLKTIKIV	++
67	LLDVLAPLV	+
68	YVLTQPPSV	+++
69	ILADLLPSL	++
70	SLTALRLLL	+
72	YSLEKVFGI	+
73	GLDGIPFTV	++
74	GLFHKQVTV	+
75	FLIKSINLV	++
77	SLIKHKIML	++
78	ALLDTVVQA	+
79	ALADIVWRA	+
80	KLASMLETL	+
83	IQWSIVPEV	++
86	GLLQGKLALL	+
88	TLAELHISL	+
89	SLLAVTEV	+
90	FTLEKNFVI	++
91	MLLSSLVSL	+
92	FLFRDILEL	+++
93	GVMAGDIYSV	++
94	ILHHKVYDL	+

037050

96	TLAETLVNL	+
97	TLISELVQA	+
98	KIPPVSPSI	+++
99	GLAPHLEQI	+
100	KLNVAPLAV	+
101	HIYDKAFITV	++
102	LLFDVHTTL	+
103	KLQDGLLHI	+++
104	ALFEGVVRQI	+++
105	ALADLDELLIRA	++
106	VLMDLKALL	+
107	VLMDLKALLL	++
108	VLISVLQAI	++
109	YLWSRVEKL	+
110	LLDLHSYLL	+
111	TLLETEMLL	+++
112	LLFDHLEPIEL	+
113	SLFDWNVKL	++
114	ALAVNISAA	++
115	LLDPKTIFL	+++
116	GLVDIMVHL	+++
117	VLFGELPAL	+++
118	FLNAIETAL	+++
119	RLHDENILL	+++
120	GLAGDNIYL	+++
121	ALLRTVVSV	++
122	SLDPSSPQV	++
123	YVDPVITSI	++
124	ILSPLSVAL	+
125	KLDPTKTTL	+++
126	KIQEILTQV	+++

127	VLAPLFVYL	++
128	YLEEDVYQL	+++
129	VLAPRVLRA	++
130	ALPTVLVGV	++
131	VMAGDIYSV	++
132	SVASTITGV	++
133	QLIDYERQL	++
134	VADKIHSV	+++
135	VVDEGPTGV	+++
136	YQDPHSTAV	++
137	TLVAIVVGV	++
138	SLDTLMTYV	++
139	ILNVDGLIGV	++
140	SLANNVTSV	++
141	LLVDDSFLHTV	+++
143	ALFVRLALA	++
145	SLHFLILYV	+
150	TLMPNINKL	+++
151	YMYEGPAPRI	+++

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

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

Эксперименты с микрочипами.

Анализ экспрессии генов всех образцов РНК из опухолевой и нормальной ткани был произведен с помощью олигонуклеотидных микрочипов Affymetrix Human Genome (HG) U133A или HG-U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Санта Клара, Калифорния, США). Все этапы были выполнены в соответствии с руководством Affymetrix. Вкратце, двухнитевую кДНК синтезировали из 5-8 мкг суммарной РНК с использованием Superscript RTII (Invitrogen) и олиго-dT-T7 праймера (MWG Biotech, Эберсберг, Германия), как описывается в руководстве. Транскрипцию *in vitro* производили с использованием набора для мечения РНК-транскриптов BioArray High Yield RNA Transcript Labelling Kit (ENZO Diagnostics, Inc., Фармингдейл, Нью-Йорк, США) для чипов U133A или набора GeneChip IVT Labelling Kit (Affymetrix) для чипов U133 Plus 2.0 с последующей фрагментацией, гибридизацией кРНК и окрашиванием стрептавидин-фикоэритрином и биотинилированным антистрептавидиновым антителом (Molecular Probes, Лейден, Нидерланды). Изображения сканировали на Agilent 2500A GeneArray Scanner (U133A) или Affymetrix Gene-Chip Scanner 3000 (U133 Plus 2.0), а данные анализировали в программе GCOS (Affymetrix) с использованием настроек по умолчанию для всех параметров. Для нормализации использовались 100 слу-

жебных генов, предоставленных Affymetrix. Относительные значения экспрессии были подсчитаны из отношений логарифмов зарегистрированных сигналов, полученных компьютерной программой, а значение для образца нормальной почки было произвольно задано значением 1,0. Типичные профили экспрессии исходных генов, предложенных в настоящем изобретении, которые в высокой степени экспрессированы в избытке или исключительно экспрессированы в клетках ПКК, представлены на фиг. 2. Показатели экспрессии других отдельных генов показаны в табл. 9.

Показатели экспрессии. В табл. 9 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 (+).

Таблица 9

Seq ID No	Название гена	последовательность	Экспрессия гена
1	SLC17A3	ALIVSLPYL	++
2	HSF4	ILWREVVTL	++
3	HSF4	RLLGEVQAL	++
6	ATP11A	VLFELSKTV	+
7	EGLN3	FLLSLIDRL	++
18	ACLY	YVLDLAAKV	+
28	ENO1,ENO2,ENO3	FIADLVVGL	+
35	ANGPTL4	VLHSLQTQL	++
37	ABCC3	VLAPVILML	+
40	IVNS1ABP	YIQEHLQI	+
50	ITGA3	SLSDHIVLL	+
51	ITGA3	NLWPMITL	+
55	SLC16A4	YLALILPVL	+
59	TGFBI	SLKNNVSV	+
62	SLC47A1	VLAGPAFLVQL	+
63	ERAP1	GLIEDHFDVTV	+
65	TPI1,TPI1P1	IYGGSVTGA	+
76	PDZK1P2,PDZK1,PDZK1P1	VLADDHLIEV	++
81	LRP2	SLLPALPKL	+
87	APOL1	LADGVQKV	++
93	PLIN2	GVMAGDIYSV	+
94	CYB5A	ILHHKVYDL	+
101	FLT1	HIYDKAFITV	++
105	HSPG2	ALADLDELLIRA	+
115	HAVCR1	LLDPKTIFL	+
120	SLC22A2	GLAGDNIYL	+
122	GAL3ST1	SLDPSSPQV	+++
123	MET	YVDPVITSI	++
125	NDRG1	KLDPTKTTL	+
127	FZD2,FZD1,FZD7	VLAPLFVYL	+
131	PLIN2	VMAGDIYSV	+
132	PLIN2	SVASTITGV	+
137	FKBP10	TLVAIVVGV	+
139	ACLY	ILNVDGLIGV	+
143	TGFBI	ALFVRLALA	+

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 сти-

муляций CD8⁺ Т-клеток искусственными антигенпрезентирующими клетками (иАПК), нагруженными комплексами пептид-МНС и антителом к CD28. Таким образом, заявители могли показать иммуногенность для пока что 22 рестриктированных по HLA-A*0201 пептидов TUMAP по изобретению, демонстрируя, что эти пептиды являются Т-клеточными эпитопами, против которых у человека имеются CD8⁺ Т-клетки-предшественники (табл. 10).

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, Кельн, 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 восемь 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, использованными в качестве положительного и отрицательного контроля, были A*0201/MLA-001 (пептид ELAGIGILTV (SEQ ID NO: 152) из модифицированного Melan-A/MART-1) и A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVNI из DDX5, SEQ ID NO: 153)) соответственно.

800000 микросфер/200 мкл вносили в лунки 96-луночного планшета в присутствии 4×12,5 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 1×10⁶ CD8⁺ Т-клеток с 2×10⁵ 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 восемь 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 ПКК.

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 мультимеров для двух пептидов по изобретению показаны на фиг. 3 вместе с соответствующими отрицательными контролями. Результаты для 3 пептидов по изобретению сведены в табл. 10А и 10Б.

В табл. 10А показана иммуногенность *in vitro* пептидов HLA I класса по изобретению. Отдельные результаты экспериментов по иммуногенности *in vitro*, проведенных заявителем для пептидов по изобретению. <20% = +; 20-49% = ++; 50-69% = +++; ≥70% = ++++.

Таблица 10А

Seq ID	Ид. № пептида	лунки	доноры
123	YVDPVITSI	+	++++
127	VLAPLFVYL	++	++++
143	ALFVRLALA	+	+++

В табл. 10Б показана иммуногенность пептидов по изобретению HLA I класса *in vitro*. Отдельные результаты экспериментов по иммуногенности *in vitro*, проведенных заявителем для пептидов по изобретению. Указаны результаты экспериментов по иммуногенности *in vitro*. Процентные доли положительных лунок и доноров (среди подлежащих оценке) обобщены согласно следующему критерию: <20% = +; 20-49% = ++; 50-69% = +++; ≥70% = ++++.

Таблица 10Б

SEQ ID No	Последовательность	Положительные лунки [%]
1	ALIVSLPYL	+
2	ILWREVVTI	+
3	RLLGEVQAL	+
6	VLFELSKTV	+
7	FLLSLIDRL	+
9	ILLQKPDSV	+
15	ILIKHLVKV	+
16	FMPEELPQL	+
18	YVLDLAAKV	++
20	AVANTTFTV	+
22	FLSPPLPSV	++
29	ILLDLEQAL	+
34	ELNNQNFYL	++
36	SLFGKKYIL	++
94	ILHNKVYDL	++
95	KLTDVGIATL	++++
98	KIPPVSPSI	++++

Пример 4. Синтез пептидов.

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

Пример 5.

Анализ связывания МНС.

Пептиды-кандидаты для Т-клеточной терапии в соответствии с настоящим изобретением далее были испытаны на их способность связываться с МНС (аффинность). Отдельные комплексы пептида и молекулы МНС были получены с помощью реакции обмена лигандами под воздействием УФ-излучения, при которой УФ-чувствительный пептид расщепляется под воздействием УФ-излучения, и получается продукт обмена с исследуемым пептидом. Только пептиды-кандидаты, которые могут эффективно связываться и стабилизировать восприимчивые к пептиду молекулы МНС, предотвращают диссоциацию комплексов с МНС. Для определения выхода продукта реакции обмена проводили анализ методом ELISA на основе обнаружения легкой цепи (β2m) стабилизированных комплексов с МНС. Этот анализ производили в основном, как описано у Rodenko et al. (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 ч при 37°C в 2% БСА, содержащем блокирующий буфер. 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 авидность по отношению к молекулам МНС и предотвращают диссоциацию комплексов МНС.

В табл. 11 приведены показатели связывания с молекулами МНС I класса. Связывание рестриктированных по молекулам HLA I класса пептидов с HLA-A*02:01 классифицировали по выходу пептидного обмена: >10% = +; >20% = ++; >50 = +++; >75% = ++++.

Таблица 11

Seq ID	Последовательность	Пептидный обмен
1	ALIVSLPYL	+++
2	ILWREVVTL	+++
3	RLLGEVQAL	++
4	FLSQDIITV	+++
5	YLYPNLTRL	++
6	VLFEFSKTV	+++
7	FLLSLIDRL	+++
8	GLASFKSFL	++
9	ILLQKPDSV	++
10	KLLQNNYGL	++
11	FIQTEAPKEV	++

037050

12	ALDPSGNQLI	++
13	KIMAQILTV	+++
14	ALLTETIFL	++
15	ILIKHLVKV	++
16	FMPEELPQL	++
17	ILAQQVHAL	+++
18	YVLDLAAKV	+++
19	LLDPGSLQL	++
20	AVANTTFTV	++
21	RLIQGDQILSV	++
22	FLSPPLPSV	+++
23	YIQEVVQYI	+++
24	FTLGTTVFL	+++
25	LLVPAHLVAA	++
27	SLSDLLVSL	+++
28	FIADLVVGL	++
29	ILLDLEQAL	+++
30	QLFYTKIFL	++
31	VLFGLDPAVIKV	+++
33	FIADVVEKI	++
34	ELNNQNFYL	+++
35	VLHSLQTQL	++
36	SLFGKKYIL	++
37	VLAPVILML	++
38	VLLDTILQL	+++
39	YLLNLNHLGL	+++
40	YIQEHLQI	+++
41	GLLKTLLQKL	++
42	VILDTGTIQL	++
43	YLKDELDEL	+++

037050

44	ALFSFVTAL	+++
45	ALLGIPLTL	+++
46	GLSEVLVQI	+++
47	TLAEVRAVQEI	+++
48	VVASNIMEV	++
49	VLIVEVPGV	+++
50	SLSDHIVLL	++
51	NLWPMILTL	+++
52	SILDAVQRV	++
53	FLLEIRQTL	++
54	ALVAKGLVQA	++
55	YLALILPVL	++
56	ILMDFSNSM	+++
57	SLQKEILYL	++
58	FLVDFEQSHL	++++
59	SLKNNVSV	+++
60	ILWKDIEYV	+++
61	SLMGILLRI	++
62	VLGPAFLVQL	+++
63	GLIEDHFDVTV	++
64	LLAASVALA	++
65	IYGGSVTGA	++
66	TLLKTIKV	++
67	LLDVLAPLV	++
68	YVLTQPPSV	++
69	ILADLLPSL	++
70	SLTALRLL	++
71	ALDGHLYAV	+++
72	YSLEKVFGI	++
73	GLDGIPFTV	+++

74	GLFHKQVTV	+++
75	FLIKSINLV	+++
76	VLADDHLIEV	++
77	SLIKHKIML	++
78	ALLDTVVQA	++
79	ALADIVWRA	+++
80	KLASMLETL	+++
81	SLLPALPKL	++
82	SLLQATDFMSL	+++
83	IQWSIVPEV	+++
84	YLMDEGAHL	++
85	FVMSEIRTV	+++
86	GLLQGKLALL	++
88	TLAELHISL	++
89	SLLLAVTEV	++
90	FTLEKNFVI	++
91	MLLSSLVSL	++
92	FLFRDILEL	+++
93	GVMAGDIYSV	++++
94	ILHHKVYDL	++
95	KLTDVGIATL	++
96	TLAETLVNL	+++
97	TLISELVQA	++
98	KIPPVSPSI	++
99	GLAPHLEQI	++
100	KLNVAPLAV	++
101	HIYDKAFITV	++
102	LLFDVHTTL	+++
103	KLQDGLLHI	++
104	ALFEGVVRQI	+++
105	ALADLDELLIRA	+++
106	VLMDLKALL	+++
107	VLMDLKALLL	+++
108	VLISVLQAI	++
109	YLWSRVEKL	++++
110	LLDLHSYLL	++
111	TLLETEMLL	++
112	LLFDHLEPIEL	+++
113	SLFDWNVKL	+++
114	ALAVNISAA	+++

Пример 6.

Абсолютное количественное определение опухолеассоциированных пептидов, презентуемых на поверхности клетки.

Получение связывающих компонентов, таких как антитела и/или ТКР, является лабораторным процессом, который может проводиться лишь для ряда выбранных мишеней. В случае опухолеассоциированных и -специфических пептидов критерии отбора включали, но не были ограничены, исключительность презентации и плотность пептида, презентуемого на поверхности клеток. Количественное определение копий TUMAP на клетку в образцах солидных опухолей требует абсолютного количественного определения выделенного пептида TUMAP, эффективности выделения TUMAP и числа клеток проанализированного образца ткани.

Количественное определение пептида с помощью нано-ЖХ-МС/МС.

Для точного количественного определения пептидов методом масс-спектрометрии проводили построение калибровочной кривой для каждого пептида при использовании метода внутреннего стандарта. Внутренний стандарт является вариантом каждого пептида с двойными изотопными метками, т.е. во время синтеза TUMAP были введены две аминокислоты с изотопными метками. От опухолеассоциированного пептида он отличается лишь по своей массе, но не имеет различий по другим физико-химическим свойствам (Anderson et al., 2012). Внутренний стандарт добавляли в известном количестве в каждый МС-образец, 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 заключение относительно эффективности выделения отдельных природных пептидов TUMAP.

Эффективность выделения анализировали на небольшом числе 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 отдельных здоровых клеток крови 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, 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 табл. 12.

В табл. 12 указаны результаты абсолютного количественного определения пептидов в опухолевых образцах НМРЛ. Медианное число копий на клетку указано для каждого пептида: $<100 = +$; $\geq 100 = ++$; $\geq 1,000 = +++$; $\geq 10,000 = ++++$. Указано число образцов, для которых имеются поддающиеся оценке, высококачественные данные МС.

Таблица 12

Абсолютное число копий

SEQ ID No.	Код пептида	Число копий на клетку (медиана)	Количество образцов
1	SLC17A3-001	++	18

Список цитируемой литературы

- PLoS.One. **10** (2015): e0119247
- Agalliu, I. et al., JAMA Neurol. **72** (2015): 58-65
- Agesen, T. H. et al., Gut **61** (2012): 1560-1567
- Alagaratnam, S. et al., Int.J Androl **34** (2011): e133-e150
- Alcoser, S. Y. et al., BMC.Biotechnol. **11** (2011): 124
- Alholle, A. et al., Epigenetics. **8** (2013): 1198-1204
- Allison, J. P. et al., Science **270** (1995): 932-933
- Altman, M. K. et al., Biochem.Res.Int. **2012** (2012): 518437
- Amatschek, S. et al., Cancer Res **64** (2004): 844-856
- Anastas, J. N. et al., J Clin Invest **124** (2014): 2877-2890
- Andersen, R. K. et al., Pigment Cell Melanoma Res. **28** (2015): 267-280
- Andersen, R. S. et al., Nat.Protoc. **7** (2012): 891-902
- Anderson, L. N. et al., PLoS.One. **8** (2013): e66768
- Anderson, N. L. et al., J Proteome.Res **11** (2012): 1868-1878
- Antony-Debre, I. et al., Cancer Cell **27** (2015): 609-611
- Appay, V. et al., Eur.J Immunol. **36** (2006): 1805-1814
- Araujo, W. F. et al., Urol.Oncol (2015)
- Arribas, A. J. et al., Blood **125** (2015): 1922-1931
- Asad, M. et al., Cell Death.Dis. **5** (2014): e1346
- Asaga, S. et al., Anticancer Res. **26** (2006): 35-42
- Avery-Kiejda, K. A. et al., BMC.Cancer **14** (2014): 253
- Avigan, D. et al., Clin Cancer Res. **10** (2004): 4699-4708
- Awasthi, N. et al., Cancer Lett. **358** (2015): 59-66
- Ayshamgul, H. et al., Chin Med.J (Engl.) **124** (2011): 341-346
- Bae, D. H. et al., J Clin Pathol. **66** (2013): 911-917
- Baek, G. et al., Cell Rep. **9** (2014): 2233-2249
- Baenke, F. et al., J Pathol. (2015)
- Bai, L. et al., J Cell Biochem. **113** (2012): 322-328
- Banchereau, J. et al., Cell **106** (2001): 271-274
- Bao, B. Y. et al., Clin Cancer Res. **17** (2011): 928-936
- Bao, W. et al., Biomed.Pharmacother. **70** (2015): 97-102
- Basson, M. D. et al., Mol.Oncol **9** (2015): 513-526
- Bauer, K. M. et al., J Proteome.Res. **13** (2014): 4910-4918
- Beatty, G. et al., J Immunol **166** (2001): 2276-2282
- Bedir, R. et al., Iran J Otorhinolaryngol. **27** (2015): 69-74

- Beggs, J. D., *Nature* **275** (1978): 104-109
- Beleford, D. et al., *Clin Cancer Res.* **16** (2010): 398-409
- Bell, J. L. et al., *Cell Mol Life Sci.* **70** (2013): 2657-2675
- Benjamini, Y. et al., *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, **Vol.57** (1995): 289-300
- Bhatnagar, R. et al., *Oral Oncol* **48** (2012): 831-835
- Bill, K. L. et al., *Lab Invest* (2015)
- Blanke, K. L. et al., *Cancer Causes Control* **25** (2014): 1513-1521
- Bleumer, I. et al., *Eur.Urol.* **44** (2003): 65-75
- Bonventre, J. V., *Trans.Am.Clin Climatol.Assoc.* **125** (2014): 293-299
- Boulter, J. M. et al., *Protein Eng* **16** (2003): 707-711
- Braumuller, H. et al., *Nature* (2013)
- Brendle, A. et al., *Carcinogenesis* **29** (2008): 1394-1399
- Brossart, P. et al., *Blood* **90** (1997): 1594-1599
- Bruckdorfer, T. et al., *Curr.Pharm.Biotechnol.* **5** (2004): 29-43
- Bunatova, K. et al., *Anticancer Res.* **32** (2012): 4601-4606
- Card, K. F. et al., *Cancer Immunol Immunother.* **53** (2004): 345-357
- Carvalho, F. L. et al., *Prostate* **74** (2014): 933-945
- Chanock, S. J. et al., *Hum.Immunol.* **65** (2004): 1211-1223
- Chatterjee, M. et al., *Haematologica* **98** (2013): 1132-1141
- Chen, K. et al., *J Cancer Res.Clin Oncol* **140** (2014a): 1715-1721
- Chen, Q. et al., *PLoS.One.* **9** (2014b): e88386
- Chen, S. T. et al., *Cancer Sci.* **102** (2011): 2191-2198
- Chen, Y. C. et al., *Int.J Cancer* **135** (2014c): 117-127
- Chen, Y. L. et al., *Int J Surg.* **11** (2013): 85-91
- Cheng, A. S. et al., *Gastroenterology* **144** (2013): 122-133

- Cheng, J. et al., *Cancer Lett.* **310** (2011): 35-45
- Cheon, D. J. et al., *Clin Cancer Res* **20** (2014): 711-723
- Cho, E. et al., *Hematol.Oncol.Clin.North Am.* **25** (2011): 651-665
- Chong, Y. et al., *Oncol Rep.* **31** (2014): 2535-2544
- Chu, X. et al., *Asian Pac.J Cancer Prev.* **15** (2014): 5819-5823
- 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
- Cuadros, T. et al., *Cancer Res* **74** (2014): 1416-1428
- Cuadros, T. et al., *Eur.J Cancer* **49** (2013): 2034-2047
- D'Angelo, V. et al., *J Neurooncol.* **117** (2014): 287-294
- Dadkhah, E. et al., *Arch.Iran Med.* **16** (2013): 463-470
- Dannenmann, S. R. et al., *Cancer Immunol.Res.* **1** (2013): 288-295
- Davidov, T. et al., *J Surg.Res.* **190** (2014): 565-574
- Deng, B. et al., *Tumour.Biol.* (2015)
- Dengjel, J. et al., *Clin Cancer Res* **12** (2006): 4163-4170
- Denkberg, G. et al., *J Immunol* **171** (2003): 2197-2207
- Devaney, J. M. et al., *Prostate Cancer Prostatic.Dis.* **16** (2013): 292-300
- Dey, N. et al., *PLoS.One.* **8** (2013): e77425
- Dienstmann, R. et al., *Am.Soc.Clin Oncol Educ.Book.* **35** (2015): e149-e156
- Ding, L. C. et al., *Oncol Rep.* (2015)
- Dong, R. et al., *PLoS.One.* **9** (2014): e85599
- El Behery, M. M. et al., *Arch.Gynecol.Obstet.* **288** (2013): 1371-1376
- Elewa, M. A. et al., *Clin Exp.Metastasis* (2015)

- Elouazzani, H. et al., *J Clin Imaging Sci.* **4** (2014): 33
- Falk, K. et al., *Nature* **351** (1991): 290-296
- Fan, H. Z. et al., *J Cancer Res.Clin Oncol* **135** (2009): 591-602
- Fang, Z. Q. et al., *Genet.Mol Res* **12** (2013): 1479-1489
- Fei, J. et al., *Tumour.Biol.* **34** (2013): 2329-2335
- Felizola, S. J. et al., *J Steroid Biochem.Mol.Biol.* **144 Pt B** (2014): 410-416
- Feng, H. et al., *J Clin Invest* **124** (2014): 3741-3756
- Ferguson, B. W. et al., *BMC.Cancer* **13** (2013): 593
- Fernandez-Banet, J. et al., *Genomics* **103** (2014): 189-203
- Ferrer-Ferrer, M. et al., *Arch.Med.Res* **44** (2013): 467-474
- Findeis-Hosey, J. J. et al., *Biotech.Histochem.* **87** (2012): 24-29
- Finocchiaro, G. et al., *Ann.Transl.Med.* **3** (2015): 83
- Fleischer, M. et al., *Genes Chromosomes.Cancer* **50** (2011): 1010-1020
- Fong, L. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98** (2001): 8809-8814
- Fontes-Oliveira, C. C. et al., *Biochim.Biophys.Acta* **1830** (2013): 2770-2778
- Forconi, F. et al., *Haematologica* **93** (2008): 697-705
- Forloni, M. et al., *Cancer Res.* **70** (2010): 916-924
- Forsey, R. W. et al., *Biotechnol.Lett.* **31** (2009): 819-823
- Franco, R. et al., *Histol.Histopathol.* **30** (2015): 707-714
- Fu, Q. F. et al., *J Hematol.Oncol* **8** (2015): 22
- Fu, Y. et al., *Mol.Biol.Rep.* **38** (2011): 693-702
- Fujinaga, T. et al., *Int.J Oncol* **44** (2014): 1614-1624
- Gabrilovich, D. I. et al., *Nat Med.* **2** (1996): 1096-1103
- Gackiere, F. et al., *Biol.Open.* **2** (2013): 941-951
- Gadd, S. et al., *Lab Invest* **90** (2010): 724-738
- Gantsev, S. K. et al., *Biomed.Pharmacother.* **67** (2013): 363-366

- Gao, H. et al., *Cancer Lett.* **344** (2014): 54-61
- Gao, H. J. et al., *J Cancer Res.Clin Oncol* **141** (2015a): 1151-1162
- Gao, W. et al., *BMC.Cancer* **15** (2015b): 367
- Garg, M. et al., *Cancer* **116** (2010a): 3785-3796
- Garg, M. et al., *Eur.J Cancer* **46** (2010b): 207-215
- Garner, J. M. et al., *PLoS.One.* **10** (2015): e0125838
- Gattinoni, L. et al., *Nat Rev.Immunol* **6** (2006): 383-393
- Gbormittah, F. O. et al., *J Proteome.Res.* **13** (2014): 4889-4900
- Gilkes, D. M. et al., *Mol Cancer Res* **11** (2013): 456-466
- Giovannetti, E. et al., *J Natl.Cancer Inst.* **106** (2014): djt346
- 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
- Goksel, G. et al., *J BUON.* **19** (2014): 207-214
- Gomez-Villafuertes, R. et al., *J Neurochem.* **131** (2014): 290-302
- Gong, Y. et al., *Adv.Anat.Pathol.* **21** (2014): 191-200
- Gonzalez, J. E. et al., *J Am.Acad.Audiol.* **25** (2014): 253-260
- Goode, G. et al., *PLoS.One.* **9** (2014): e100103
- Granja, S. et al., *Oncotarget.* **6** (2015): 6708-6721
- Green, M. R. et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* **4th** (2012)
- Greenfield, E. A., *Antibodies: A Laboratory Manual* **2nd** (2014)
- Griffith, O. L. et al., *J Clin.Oncol.* **24** (2006): 5043-5051
- Grunewald, T. G. et al., *Biol.Cell* **105** (2013): 535-547
- Guerrero-Preston, R. et al., *Epigenetics.* **9** (2014): 1031-1046
- Guo, P. et al., *Onco.Targets.Ther.* **8** (2015): 73-79
- Halldorsdottir, A. M. et al., *Am.J Hematol.* **87** (2012): 361-367
- Han, B. et al., *Mol.Cancer* **14** (2015): 64

- Havens, M. A. et al., PLoS.Genet. **10** (2014): e1004312
- Heist, R. S. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **112** (2015): 1547-1552
- Hevir-Kene, N. et al., Chem Biol.Interact. **234** (2015): 309-319
- Hirota, E. et al., Int.J Oncol. **29** (2006): 799-827
- Hlavac, V. et al., Medicine (Baltimore) **93** (2014): e255
- Hoffmann, N. E. et al., Cancer **112** (2008): 1471-1479
- Hofmann, H. S. et al., Eur.Urol. **48** (2005): 77-81
- Hogan, L. E. et al., Blood **118** (2011): 5218-5226
- Holtl, L. et al., Clin.Cancer Res. **8** (2002): 3369-3376
- Honke, K. et al., J Biochem. **119** (1996): 421-427
- Hovnanian, A., Subcell.Biochem. **45** (2007): 337-363
- Hu, C. A. et al., FEBS Lett. **586** (2012): 947-955
- Hu, M. et al., J Surg.Oncol **108** (2013): 192-196
- Hu, S. et al., J Cancer Res Clin Oncol **140** (2014): 883-893
- Hu, Y. et al., Mol.Cancer Ther. **14** (2015): 289-297
- Hua, D. et al., Int.J Mol Med. **30** (2012): 1267-1274
- Huang, C. N. et al., Ann.Oncol **23** (2012a): 707-713
- Huang, G. et al., J Surg.Oncol **105** (2012b): 420-424
- Huang, Y. et al., Cell Biosci. **3** (2013): 16
- Hung, T. H. et al., Int.J Biochem.Cell Biol. **53** (2014): 55-65
- Hunt, J. D. et al., Int.J Cancer **114** (2005): 101-108
- Hwang, M. L. et al., J Immunol. **179** (2007): 5829-5838
- Ihm, K. et al., Mol.Cancer **14** (2015): 38
- Inoue, Y. et al., Cancer Chemother.Pharmacol. (2015)
- Inzelberg, R. et al., Neurology **78** (2012): 781-786
- Ishiguro, Y. et al., Gan **75** (1984): 53-60

- Jeng, Y. M. et al., Br.J Surg. **96** (2009): 66-73
- Jensen, D. H. et al., J Oral Pathol.Med. (2014)
- Jiang, J. G. et al., Cancer Res **65** (2005): 4707-4715
- Jiao, J. et al., Cancer Lett. **320** (2012): 96-103
- Jin, Z. et al., Anticancer Res. **33** (2013): 5199-5203
- Joerger, M. et al., Prostate Cancer Prostatic.Dis. **18** (2015): 167-172
- Johnson, R. H. et al., Oncotarget. (2015)
- Jose-Eneriz, E. S. et al., Br.J Haematol. **142** (2008): 571-582
- Jung, G. et al., Proc Natl Acad Sci U S A **84** (1987): 4611-4615
- Junnila, S. et al., BMC.Cancer **10** (2010): 73
- Kamphausen, E. et al., Cancer Immunol.Immunother. **59** (2010): 1273-12
- Kang, M. R. et al., J Pathol. **217** (2009): 702-706
- Karagiannis, G. S. et al., Mol.Oncol **8** (2014): 1240-1252
- Katoh, M. et al., Oncol Rep. **13** (2005): 367-370
- Kawahara, R. et al., PLoS.One. **9** (2014): e115004
- Kawakami, K. et al., Int.J Oncol (2015)
- Khan, R. et al., Clin.Proteomics. **10** (2013a): 6
- Khan, Z. et al., Cancer Invest **31** (2013b): 404-411
- Kibbe, A. H., Handbook of Pharmaceutical Excipients **rd** (2000)
- Kim, J. H. et al., J Korean Med.Sci. **8** (1993): 68-72
- Kim, J. S. et al., Cancer Biol.Ther. **13** (2012): 638-646
- Kim, M. et al., Mol Cancer Res **6** (2008): 222-230
- Kirov, A. et al., J Cell Biochem. (2015)
- Kleiber, K. et al., Anticancer Res. **27** (2007): 55-61
- Kobayashi, H. et al., Oncol Lett. **10** (2015): 612-618
- Koh, J. et al., Mol.Endocrinol. **25** (2011): 867-876

- Komatsu, S. et al., Br.J Cancer **112** (2015): 357-364
- Konno, R., Hum.Cell **14** (2001): 261-266
- Koo, J. S. et al., Am.J Clin Pathol. **143** (2015): 584-592
- Korosec, B. et al., Cancer Genet.Cytogenet. **171** (2006): 105-111
- Koshikawa, K. et al., Oncogene **21** (2002): 2822-2828
- Krieg, A. M., Nat Rev.Drug Discov. **5** (2006): 471-484
- Kuang, S. Q. et al., Leukemia **22** (2008): 1529-1538
- Kubota, H. et al., Cell Stress.Chaperones. **15** (2010): 1003-1011
- Kumps, C. et al., PLoS.One. **8** (2013): e52321
- Kwon, J. et al., Int J Oncol **43** (2013): 1523-1530
- Lai, K. K. et al., PLoS.Genet. **7** (2011): e1002147
- Lai, Y. J. et al., Mol.Cell Biol. **30** (2010): 5582-5596
- Lapointe, J. et al., Endocrinology **140** (1999): 4486-4493
- Lebdai, S. et al., Urol.Oncol **33** (2015): 69-8
- Lee, H. J. et al., Oncol Lett. **8** (2014): 1986-1992
- Lee, H. K. et al., Oncotarget. **6** (2015): 1850-1864
- Lee, J. et al., Yonsei Med.J **54** (2013): 1158-1167
- Li, J. et al., J Mol.Histol. **45** (2014a): 47-57
- Li, M. et al., Int.J Oncol. **24** (2004): 305-312
- Li, R. et al., Curr.Cancer Drug Targets. **14** (2014b): 274-285
- Li, W. et al., Int.J Clin Exp.Pathol. **6** (2013): 2430-2440
- Li, X. X. et al., Int.J Clin Exp.Pathol. **7** (2014c): 2729-2736
- Li, Y. et al., BMC.Cancer **15** (2015): 417
- Liddy, N. et al., Nat Med. **18** (2012): 980-987
- Lin, L. et al., Oncol Lett. **6** (2013): 740-744
- Lin, M. C. et al., Oral Oncol **50** (2014): 478-484

- Lin, Y. W. et al., *Eur.J Cancer* **45** (2009): 2041-2049
- Lin, Z. Y. et al., *Biomed.Pharmacother.* **66** (2012): 454-458
- Liu, B. et al., *Zhonghua Fu Chan Ke.Za Zhi.* **45** (2010a): 41-44
- Liu, F. et al., *World J Surg.Oncol* **12** (2014a): 333
- Liu, H. et al., *Carcinogenesis* **34** (2013): 885-892
- Liu, J. et al., *Oncotarget.* (2015)
- Liu, K. et al., *Tumour.Biol.* **35** (2014b): 995-1002
- Liu, S. et al., *Tumour.Biol.* **35** (2014c): 9897-9904
- Liu, Y. et al., *J Neurooncol.* **99** (2010b): 13-24
- Liu, Y. et al., *Mol.Cancer* **9** (2010c): 186
- Ljungberg, B. et al., *Eur.Urol.* **60** (2011): 615-621
- Ljunggren, H. G. et al., *J Exp.Med.* **162** (1985): 1745-1759
- Longenecker, B. M. et al., *Ann N.Y.Acad.Sci.* **690** (1993): 276-291
- Lourenco, G. J. et al., *Breast Cancer Res Treat.* **100** (2006): 335-338
- Lu, Y. Y. et al., *Zhongguo Shi Yan.Xue.Ye.Xue.Za Zhi.* **22** (2014): 1336-1340
- Lukas, T. J. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **78** (1981): 2791-2795
- Lundblad, R. L., *Chemical Reagents for Protein Modification* **3rd** (2004)
- Lung, H. L. et al., *Int.J Cancer* **127** (2010): 304-312
- Lustosa, S. A. et al., *ScientificWorldJournal.* **2014** (2014): 102541
- Lv, Z. et al., *Tumour.Biol.* **35** (2014): 10497-10502
- Ma, G. F. et al., *Eur.Rev.Med.Pharmacol.Sci.* **19** (2015): 578-585
- Ma, J. et al., *Pathol.Oncol Res* **19** (2013): 821-832
- Mak, A. B. et al., *J Mol.Biol.* **426** (2014): 2175-2182
- Malik, M. A. et al., *Mol.Biol.Rep.* **39** (2012): 9095-9104
- Marten, A. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* **51** (2002): 637-644
- Martinez-Lopez, N. et al., *Gastroenterology* **143** (2012): 787-798

- Massari, F. et al., *Cancer Treat.Rev.* **41** (2015): 114-121
- Masugi, Y. et al., *Lab Invest* **95** (2015): 308-319
- Matsubara, J. et al., *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **20** (2011): 2195-2203
- Mehta, A. M. et al., *Immunogenetics* **67** (2015): 267-275
- Mei, J. et al., *Oncogene* **25** (2006): 849-856
- Mertens-Walker, I. et al., *BMC.Cancer* **15** (2015): 164
- Meziere, C. et al., *J Immunol* **159** (1997): 3230-3237
- Michael, A. et al., *Lancet Oncol.* **4** (2003): 215-223
- Minami, T. et al., *Int.Immunopharmacol.* **20** (2014): 59-65
- Minchenko, O. H. et al., *World J Gastroenterol.* **20** (2014): 13705-13717
- Miyoshi, N. et al., *Oncol Rep.* **23** (2010): 505-510
- Mo, Y. et al., *Cancer Lett.* **323** (2012): 147-154
- Moch, H., *Semin.Cancer Biol.* **23** (2013): 3-9
- Mochizuki, S. et al., *Cancer Sci.* **98** (2007): 621-628
- Mohelnikova-Duchonova, B. et al., *Cancer Chemother.Pharmacol.* **72** (2013a): 669-682
- Mohelnikova-Duchonova, B. et al., *Pancreas* **42** (2013b): 707-716
- Molina-Pinelo, S. et al., *PLoS.One.* **9** (2014): e90524
- Morgan, R. A. et al., *Science* **314** (2006): 126-129
- Mori, M. et al., *Transplantation* **64** (1997): 1017-1027
- Moriya, Y. et al., *Oral Oncol* **51** (2015): 84-89
- Morrissey, J. J. et al., *Urology* **83** (2014): 256-14
- Mortara, L. et al., *Clin Cancer Res.* **12** (2006): 3435-3443
- Motzer, R. J. et al., *Clin.Cancer Res.* **10** (2004): 6302S-6303S
- Moutinho, C. et al., *J Natl.Cancer Inst.* **106** (2014): djt322
- Mueller, L. N. et al., *J Proteome.Res* **7** (2008): 51-61
- Mueller, L. N. et al., *Proteomics.* **7** (2007): 3470-3480

- Mukai, M. et al., *Am.J Surg.Pathol.* **10** (1986): 212-218
- Mumberg, D. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96** (1999): 8633-8638
- Mustafa, D. A. et al., *Gene Regul.Syst.Bio* **4** (2010): 103-107
- Nagy, Z. et al., *Mol.Cancer* **13** (2014): 96
- Nakai, Y. et al., *J Cancer Res.Clin Oncol* **141** (2015): 933-939
- Narjoz, C. et al., *PLoS.One.* **9** (2014): e95532
- Narkiewicz, J. et al., *Oncol Rep.* **21** (2009): 1529-1537
- Naryzhnyi, S. N. et al., *Biomed.Khim.* **60** (2014): 308-321
- Ng, K. T. et al., *Mol.Cancer* **13** (2014): 196
- Nguyen, H. et al., *J Biol.Chem* **290** (2015): 13641-13653
- Ni, I. B. et al., *Hematol.Rep.* **4** (2012): e19
- Nikitovic, D. et al., *Biochim.Biophys.Acta* **1840** (2014): 2471-2481
- Nimptsch, K. et al., *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **18** (2009): 49-56
- Nishio, S. et al., *Cancer Lett.* **264** (2008): 36-43
- Notaridou, M. et al., *Int.J Cancer* **128** (2011): 2063-2074
- Nowak, D. et al., *Blood* **115** (2010): 1049-1053
- Oka, K. et al., *Lab Invest* **60** (1989): 38-44
- Okudela, K. et al., *PLoS.One.* **9** (2014): e87193
- Olesen, S. H. et al., *Mol Cell Proteomics.* **4** (2005): 534-544
- Ozawa, D. et al., *Ann.Surg.Oncol* (2014)
- Paradis, V. et al., *Gut* **62** (2013): 911-919
- Pathan, N. et al., *J Biol.Chem* **276** (2001): 32220-32229
- Pavlikova, N. et al., *Exp.Cell Res.* **333** (2015): 1-10
- Pedersen, M. O. et al., *Leuk.Lymphoma* **51** (2010): 314-328
- Penning, T. M., *Chem Res.Toxicol.* **27** (2014): 1901-1917
- Pereira, P. M. et al., *Org.Biomol.Chem.* **12** (2014): 1804-1811

- Peters, D. G. et al., *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **14** (2005): 1717-1723
- Petrini, I., *Ann.Transl.Med.* **3** (2015): 82
- Pinheiro, J. et al., *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models* (<http://CRAN.R-project.org/package=nlme>) (2015)
- Planutis, K. et al., *J Transl.Med.* **11** (2013): 50
- Plebanski, M. et al., *Eur.J Immunol* **25** (1995): 1783-1787
- Porta, C. et al., *Virology* **202** (1994): 949-955
- Prakash, S. et al., *J Pediatr.Hematol.Oncol* **27** (2005): 179-187
- Principe, M. et al., *Oncotarget.* **6** (2015): 11098-11113
- Qian, Z. et al., *Chem Biol.Interact.* **184** (2010): 50-57
- Quinn, M. C. et al., *Int J Oncol* **42** (2013): 912-920
- Ragnum, H. B. et al., *Int.J Radiat.Oncol Biol.Phys.* **87** (2013): 753-760
- Ramazotti, G. et al., *Crit Rev.Eukaryot.Gene Expr.* **21** (2011): 291-301
- Rammensee, H. G. et al., *Immunogenetics* **50** (1999): 213-219
- RefSeq, The NCBI handbook [Internet], Chapter 18, (2002), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21091/>
- Rehfeld, A. et al., *Front Endocrinol.(Lausanne)* **5** (2014): 46
- Ren, Y. et al., *Mol.Cell Proteomics.* **13** (2014): 3126-3137
- Rehman, A. G. et al., *Int.J Cancer* **126** (2010): 692-702
- Rehman, A. G. et al., *Lancet* **371** (2008): 569-578
- Renkvist, N. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* **50** (2001): 3-15
- Richardson, A. et al., *Crit Rev.Oncog.* **18** (2013): 409-434
- Rini, B. I. et al., *Curr.Opin.Oncol.* **20** (2008): 300-306
- Rini, B. I. et al., *Cancer* **107** (2006): 67-74
- Rock, K. L. et al., *Science* **249** (1990): 918-921
- Rocken, C. et al., *Pathologe* **33 Suppl 2** (2012): 235-240
- Rodenko, B. et al., *Nat Protoc.* **1** (2006): 1120-1132

- Royds, J. A. et al., *J Clin Pathol.* **38** (1985): 1258-1260
- Ruiz-Martinez, J. et al., *Mov Disord.* **29** (2014): 750-755
- Sachdeva K et al., <http://emedicine.medscape.com/article/281340-overview> (2010)
- Sahasrabudde, N. A. et al., *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **446** (2014): 863-869
- Saiki, R. K. et al., *Science* **239** (1988): 487-491
- Sakamoto, L. H. et al., *Leuk.Res.* **38** (2014): 496-502
- Sasnauskiene, A. et al., *Medicina (Kaunas.)* **50** (2014): 14-18
- Sato, T. et al., *PLoS.One.* **8** (2013): e59444
- Schlomann, U. et al., *Nat Commun.* **6** (2015): 6175
- Schuetz, A. N. et al., *J Mol.Diagn.* **7** (2005): 206-218
- Schumann, T. et al., *Oncotarget.* (2015)
- Scrideli, C. A. et al., *Leuk.Res.* **34** (2010): 32-37
- Sedlakova, I. et al., *Int.J Gynecol.Cancer* **25** (2015): 236-243
- Seeger, F. H. et al., *Immunogenetics* **49** (1999): 571-576
- Seong, J. et al., *Mol.Biol.Rep.* **39** (2012): 3597-3601
- Sethakorn, N. et al., *J Recept.Signal.Transduct.Res.* **33** (2013): 166-171
- Sherman, F. et al., *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics* (1986)
- Shu, J. et al., *Cancer Res.* **66** (2006): 5077-5084
- Shukla, S. et al., *Cancer Res.* **73** (2013): 6563-6573
- Sieuwerts, A. M. et al., *Clin.Chem* **53** (2007): 1280-1288
- Sigari, N. et al., *Clin Lab* **60** (2014): 23-27
- Silva, L. P. et al., *Anal.Chem.* **85** (2013): 9536-9542
- Singh, S. et al., *Tumour.Biol.* (2014)
- Singh-Jasuja, H. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* **53** (2004): 187-195
- Slater, E. P. et al., *Transl.Oncol.* **6** (2013): 99-103
- Small, E. J. et al., *J Clin Oncol.* **24** (2006): 3089-3094

- Song, J. et al., PLoS.One. **9** (2014): e110074
- Sowalsky, A. G. et al., Mol.Cancer Res. **13** (2015): 98-106
- Sprowl, J. A. et al., Clin Pharmacol.Ther. **94** (2013): 585-592
- Staal-Viliare, A. et al., Leuk.Lymphoma **48** (2007): 439-441
- Staepli, F. et al., J Immunol. **188** (2012): 3820-3828
- Stamatopoulos, K. et al., Blood **106** (2005): 3575-3583
- Stein, U., Expert.Opin.Ther.Targets. **17** (2013): 1039-1052
- Steinway, S. N. et al., PLoS.One. **10** (2015): e0128159
- Stoehr, C. G. et al., Int.J Clin Exp.Pathol. **6** (2013): 998-1008
- Strekalova, E. et al., Clin.Cancer Res. (2015)
- Sturm, M. et al., BMC.Bioinformatics. **9** (2008): 163
- Su, H. et al., J Transl.Med. **13** (2015): 104
- Su, Z. et al., Cancer Res. **63** (2003): 2127-2133
- Suh, K. S. et al., Clin.Cancer Res. **13** (2007a): 121-131
- Suh, K. S. et al., Mol.Carcinog. **46** (2007b): 599-604
- Suhovskih, A. V. et al., Cell Tissue Res. (2015)
- Sun, W. et al., Cancer Res. **74** (2014a): 1091-1104
- Sun, Z. et al., J Proteome.Res **13** (2014b): 1593-1601
- Szarvas, T. et al., Int J Cancer **135** (2014): 1596-1604
- Taguchi, O. et al., Clin Chim.Acta **244** (1996): 69-81
- Tam, C. W. et al., Endocrinology **147** (2006): 5023-5033
- Tan, M. H. et al., Breast Cancer Res.Treat. **131** (2012): 849-858
- Tanaka, J. et al., J Oral Pathol.Med. **44** (2015): 126-133
- Tanaka, T. et al., J Cancer Res.Clin Oncol **140** (2014): 503-513
- Tanic, N. et al., Anticancer Res. **26** (2006): 2137-2142
- Tashiro, A. et al., Am.J Cancer Res. **4** (2014): 528-536

- Teufel, R. et al., *Cell Mol Life Sci.* **62** (2005): 1755-1762
- Thiel, A. et al., *Oncol Rep.* **26** (2011): 615-620
- Tong, S. Y. et al., *Cancer Invest* **30** (2012): 642-645
- Tong, W. G. et al., *Epigenetics.* **5** (2010): 499-508
- Toth, K. et al., *Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol.* **22** (2014): 642-647
- Tran, E. et al., *Science* **344** (2014a): 641-645
- Tran, T. T. et al., *Photochem.Photobiol.* **90** (2014b): 1136-1143
- Tsourlakis, M. C. et al., *Int.J Mol.Sci.* **16** (2015): 8591-8606
- Vachani, A. et al., *Clin Cancer Res.* **13** (2007): 2905-2915
- Vasiljevic, A. et al., *Neuropathology.* **33** (2013): 149-161
- Volz, N. B. et al., *Pharmacogenomics.J* **15** (2015): 69-76
- Wake, N. C. et al., *Hum.Mutat.* **34** (2013): 1650-1661
- Walter, S. et al., *J Immunol* **171** (2003): 4974-4978
- Walter, S. et al., *Nat Med.* **18** (2012): 1254-1261
- Wang, B. S. et al., *Cell Stress.Chaperones.* **18** (2013a): 359-366
- Wang, D. et al., *Mol.Cell Biochem.* **396** (2014a): 67-77
- Wang, G. et al., *Tumour.Biol* **36** (2015a): 1055-1065
- Wang, H. et al., *J Biol.Chem* **289** (2014b): 4009-4017
- Wang, J. H. et al., *World J Gastroenterol.* **16** (2010a): 5642-5646
- Wang, L. H. et al., *Tumour.Biol.* **35** (2014c): 1157-1168
- Wang, R. et al., *Biomed.Res.Int.* **2013** (2013b): 195692
- Wang, T. P. et al., *Exp.Cell Res.* **316** (2010b): 2893-2902
- Wang, W. M. et al., *Mol.Med.Rep.* (2015b)
- Wang, Y. et al., *J Biol.Chem* **289** (2014d): 14225-14238
- Wang, Y. et al., *Clin.Chem Lab Med.* **48** (2010c): 1475-1479
- Wang, Y. et al., *Anticancer Res* **33** (2013c): 207-214

- Wang, Y. et al., *Pathol.Oncol Res.* **20** (2014): 611-618
- Wang, Z. et al., *J Cancer Res Clin Oncol* **141** (2015c): 1353-1361
- Warren, C. R. et al., *J Cell Biochem.* **115** (2014): 1322-1333
- Waugh, M. G., *Mol.Neurobiol.* (2014)
- Wei, Q. et al., *Cancer Res.* **69** (2009): 2332-2339
- Westphal, P. et al., *Am.J Clin Pathol.* **143** (2015): 248-256
- Wierecky, J. et al., *Cancer Res.* **66** (2006): 5910-5918
- Wikman, H. et al., *PLoS.One.* **7** (2012): e47537
- Willcox, B. E. et al., *Protein Sci.* **8** (1999): 2418-2423
- Wittig, B. et al., *Hum.Gene Ther.* **12** (2001): 267-278
- Wlodarski, M. W. et al., *J Leukoc.Biol* **83** (2008): 589-601
- World Cancer Report, (2014)
- World Health Organization Classification of Tumours, (2004)
- Wu, M. et al., *Oncogene* **23** (2004): 6815-6819
- Wu, Y. M. et al., *Cancer Res* **71** (2011): 7270-7279
- Xiao, L. et al., *Biochim.Biophys.Acta* (2015)
- Xiao, W. et al., *Mol.Med.Rep.* **10** (2014): 453-458
- Xin, Z. et al., *Virchows Arch.* **465** (2014): 35-47
- Xu, Y. et al., *J Cell Biochem.* **115** (2014): 1112-1121
- Xu, Z. et al., *Oncol Rep.* **33** (2015): 2899-2907
- Yamamoto, M. et al., *Cancer Res.* **65** (2005): 8706-8714
- Yan, P. et al., *Asian Pac.J Cancer Prev.* **15** (2014): 8923-8929
- Yang, C. Y. et al., *J Immunol* **192** (2014a): 1547-1557
- Yang, D. et al., *Oncogene* **30** (2011): 4590-4600
- Yang, J. et al., *J Proteomics.* **109** (2014b): 162-175
- Yang, W. et al., *Med.Oncol* **31** (2014c): 826

- Yang, W. et al., *Tumour.Biol.* **35** (2014d): 8267-8279
- Yano, Y. et al., *Cancer Lett.* **207** (2004): 139-147
- Yao, Y. et al., *Cell Physiol Biochem.* **35** (2015): 983-996
- Yeh, I. et al., *Nat.Comm.* **6** (2015): 7174
- Yeom, S. Y. et al., *Mol.Cancer Ther.* **13** (2014): 3049-3061
- Yin, Y. et al., *Tumour.Biol.* **34** (2013): 3611-3617
- Yoshida, A. et al., *Hum.Cell* **26** (2013): 56-66
- Yoshida, Y. et al., *Anticancer Res.* **32** (2012): 2301-2308
- Yu, P. H. et al., *PLoS.One.* **8** (2013): e82254
- Yu, Z. et al., *Cancer Lett.* **353** (2014): 182-193
- Yuan, R. H. et al., *Ann Surg.Oncol* **16** (2009): 1711-1719
- Zaghloul, R. A. et al., *Eur.J Pharmacol.* **746** (2015): 353-362
- Zamani-Ahmadmahmudi, M. et al., *Electrophoresis* **35** (2014): 901-910
- Zaremba, S. et al., *Cancer Res.* **57** (1997): 4570-4577
- Zhang, B. et al., *Blood* **106** (2005): 1355-1361
- Zhang, H. et al., *Cancer Lett.* **323** (2012a): 106-113
- Zhang, J. et al., *Mol.Med.Rep.* **10** (2014a): 749-754
- Zhang, J. et al., *Xi.Bao.Yu Fen.Zi.Mian.Yi.Xue.Za Zhi.* **29** (2013): 190-193
- Zhang, L. et al., *Dig.Dis.Sci.* **57** (2012b): 2608-2614
- Zhang, S. D. et al., *Onco.Targets.Ther.* **8** (2015): 835-843
- Zhang, X. D. et al., *Int.J Clin Exp.Med.* **7** (2014b): 1190-1196
- Zhao, M. et al., *Cancer Invest* **32** (2014): 464-469
- Zhao, M. et al., *Oncotarget.* (2015a)
- Zhao, Z. et al., *Med.Oncol* **32** (2015b): 112
- Zhen, T. et al., *Oncotarget.* **5** (2014): 3756-3769
- Zhou, J. et al., *Oncol Rep.* **30** (2013): 2229-2237
- Zhu, J. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* **8** (2015): 702-710
- Zienert, E. et al., *Cancer Lett.* **364** (2015): 17-24
- Zietek, Z. et al., *Pol.Tyg.Lek.* **51** (1996): 86-88
- Zizi-Sermpetzoglou, A. et al., *Eur.J Gynaecol.Oncol* **35** (2014): 325-327
- Zu, X. Y. et al., *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* **7** (2012): 154-167
- Zubor, P. et al., *Mol.Biol.Rep.* **42** (2015): 977-988
- Zuniga-Garcia, V. et al., *Dig.Dis.Sci.* (2015)
- Zurawa-Janicka, D. et al., *Oncol Rep.* **28** (2012): 1838-1844
- Follenzi A, et al. *Nat Genet.* 2000 Jun;25(2):217-22.
- Zufferey R, et al. *J Virol.* 1999 Apr;73(4):2886-92.
- Scholten KB, et al. *Clin Immunol.* 2006 May;119(2):135-45.
- Gustafsson C, et al. *Trends Biotechnol.* 2004 Jul;22(7):346-53. Review.
- Kuball, J., et al. (2007). *Blood* 109, 2331–2338.
- Schmitt, T. M., et al. (2009). *Hum. Gene Ther.* 20, 1240–1248

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептид, который связывается с молекулой(ами) главного комплекса гистосовместимости (МНС), включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, причем указанный пептид имеет общую длину от 8 до 30 аминокислот, или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12, или его фармацевтически приемлемая соль.
2. Пептид по п.1, где указанный пептид имеет общую длину до 14 аминокислот.
3. Пептид по п.1 или 2, где указанный пептид состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12.
4. Пептид по любому из пп.1-3, где указанный пептид включает непептидные связи.
5. Пептид по любому из пп.1-4, где указанный пептид слит с N-терминальными аминокислотами антиген-ассоциированной инвариантной цепи (Ii) HLA-DR или где указанный пептид слит с антителом.
6. Т-клеточный рецептор, реагирующий с HLA-лигандом, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12.
7. Т-клеточный рецептор, реагирующий с HLA-лигандом, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12, где указанный лиганд является частью комплекса пептид-МНС.
8. Т-клеточный рецептор по п.6 или 7, являющийся рекомбинантным, растворимым или связанным с мембраной Т-клеточным рецептором.
9. Антитело, которое специфически распознает пептид по любому из пп.1-4; пептид по любому из пп.1-4, слитый с N-терминальными аминокислотами антиген-ассоциированной инвариантной цепи (Ii) HLA-DR; или пептид по любому из пп.1-4, когда он связан с молекулой МНС.
10. Антитело по п.9, являющееся растворимым или связанным с мембраной антителом.
11. Нуклеиновая кислота, кодирующая пептид по любому из пп.1-5.
12. Нуклеиновая кислота по п.11, связанная с гетерологичной последовательностью промотора.
13. Рекомбинантная клетка-хозяин, включающая пептид по любому из пп.1-5 или нуклеиновую кислоту по п.11 или 12.
14. Рекомбинантная клетка-хозяин по п.13, где указанная клетка-хозяин является антигенпрезентирующей клеткой, такой как дендритная клетка, или где указанная клетка-хозяин является Т-клеткой или НК-клеткой.
15. Способ получения пептида по любому из пп.1-5, включающий культивирование клетки-хозяина по п.13 или 14, которая презентует пептид по пп.1-5 или включает нуклеиновую кислоту по п.11 или 12, и выделение пептида из клетки-хозяина или его культуральной среды.
16. Способ получения Т-клеточного рецептора по любому из пп.6-8, включающий культивирование клетки-хозяина по п.13 или 14, которая презентует пептид по пп.1-5 или включает нуклеиновую кислоту по п.11 или 12, и выделение указанного ТКР из клетки-хозяина или его культуральной среды.
17. Способ получения антитела по п.9 или 10, включающий культивирование клетки-хозяина по п.13 или 14, которая презентует пептид по пп.1-5 или включает нуклеиновую кислоту по п.11 или 12, и выделение указанного антитела из клетки-хозяина или его культуральной среды.
18. Способ получения активированных Т-лимфоцитов *in vitro*, включающий контактирование Т-клеток *in vitro* с нагруженными антигеном молекулами МНС человека I класса, экспрессированными на поверхности подходящей антигенпрезентирующей клетки или искусственной антигенпрезентирующей клетки, в течение периода времени, достаточного для активации указанных Т-клеток антигенспецифическим образом, где указанный антиген является пептидом по любому из пп.1-4.
19. Активированный Т-лимфоцит, полученный способом по п.18, который селективно распознает клетку, которая презентует полипептид, включающий аминокислотную последовательность, указанную в любом из пп.1-4.
20. Фармацевтическая композиция для лечения рака, включающая по меньшей мере один активный ингредиент, выбранный из группы, состоящей из пептида по любому из пп.1-5, Т-клеточного рецептора по любому из пп.6-8, антитела по п.9 или 10, нуклеиновой кислоты по п.11 или 12, клетки по п.13 или 14 или активированного Т-лимфоцита по п.19, и фармацевтически приемлемый носитель.
21. Фармацевтическая композиция по п.20, включающая пептид по любому из пп.1-5, являющаяся вакцинной композицией для вызывания противоопухолевых иммунных ответов.
22. Применение пептида по любому из пп.1-5 в диагностике и/или лечении рака.
23. Применение Т-клеточного рецептора по любому из пп.6-8 в диагностике и/или лечении рака.
24. Применение антитела по п.9 или 10 в диагностике и/или лечении рака.
25. Применение пептида по любому из пп.1-5 в диагностике и/или лечении рака, где указанный рак выбран из группы: рак легких, рак головного мозга, рак желудка, колоректальный рак, рак печени, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, лейкоз, рак молочной железы, меланома, рак яичника, рак пищевода и другие опухоли, которые демонстрируют избыточную экспрессию белка, из которого получен пептид с последовательностью SEQ ID NO: 12.

26. Применение Т-клеточного рецептора по любому из пп.6-8 в диагностике и/или лечении рака, где указанный рак выбран из группы: рак легких, рак головного мозга, рак желудка, колоректальный рак, рак печени, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, лейкоз, рак молочной железы, меланома, рак яичника, рак пищевода и другие опухоли, которые демонстрируют избыточную экспрессию белка, из которого получен пептид с последовательностью SEQ ID NO: 12.

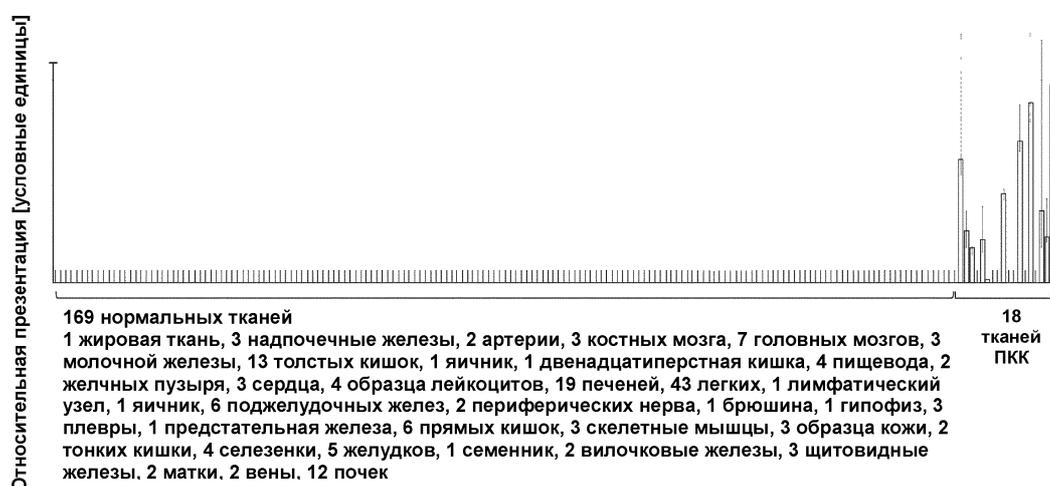
27. Применение антитела по п.9 или 10 в диагностике и/или лечении рака, где указанный рак выбран из группы: рак легких, рак головного мозга, рак желудка, колоректальный рак, рак печени, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, лейкоз, рак молочной железы, меланома, рак яичника, рак пищевода и другие опухоли, которые демонстрируют избыточную экспрессию белка, из которого получен пептид с последовательностью SEQ ID NO: 12.

28. Набор для лечения рака, включающий:

(а) контейнер, включающий фармацевтическую композицию, содержащую пептид по любому из пп.1-5, Т-клеточный рецептор по любому из пп.6-8, антитело по п.9 или 10, нуклеиновую кислоту по п.11 или 12, клетку по п.13 или 14 или активированный Т-лимфоцит по п.19 в виде раствора или в лиофилизированной форме; и

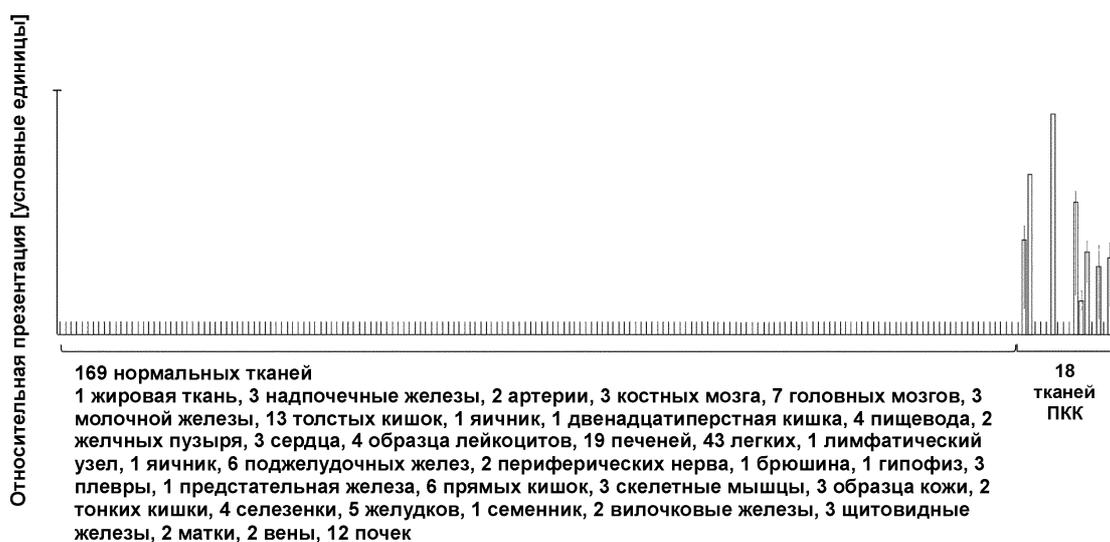
(б) второй контейнер, содержащий разбавитель или восстанавливающий раствор для лиофилизированного состава.

Пептид: ALIVSLPYL (A*02)



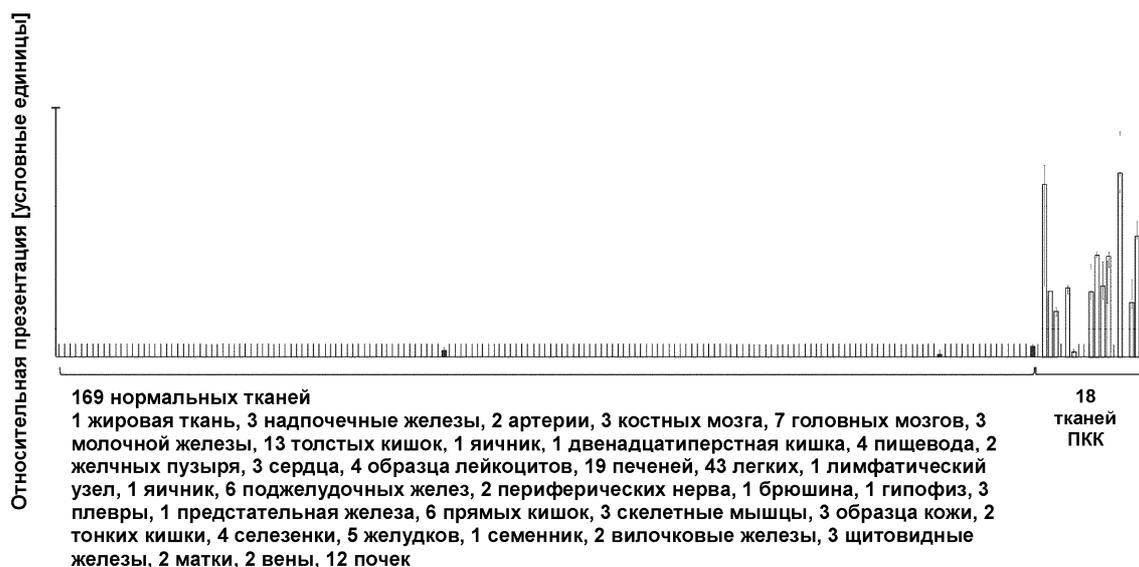
Фиг. 1А

Пептид: YLEEDVYQL (A*02)



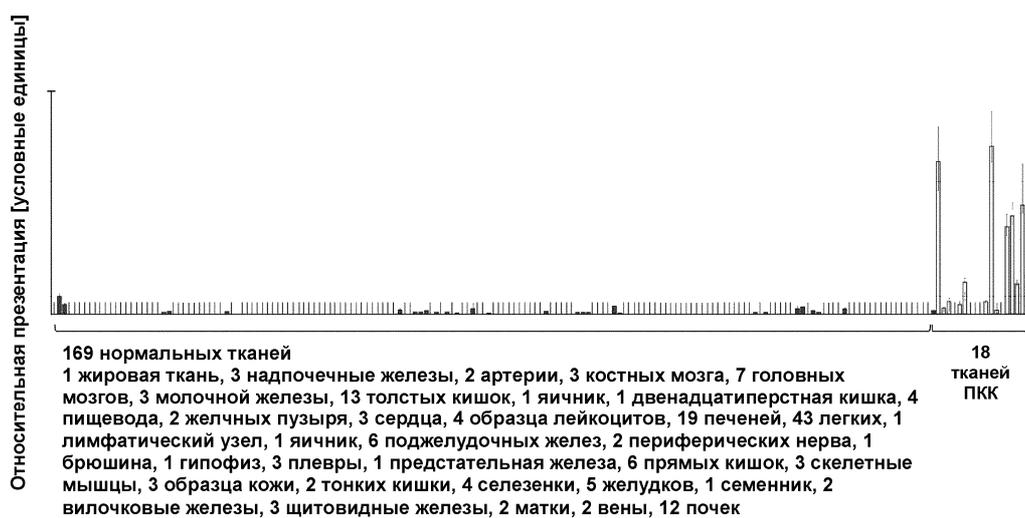
Фиг. 1В

Пептид: ALDPSGNQLI (A*02)



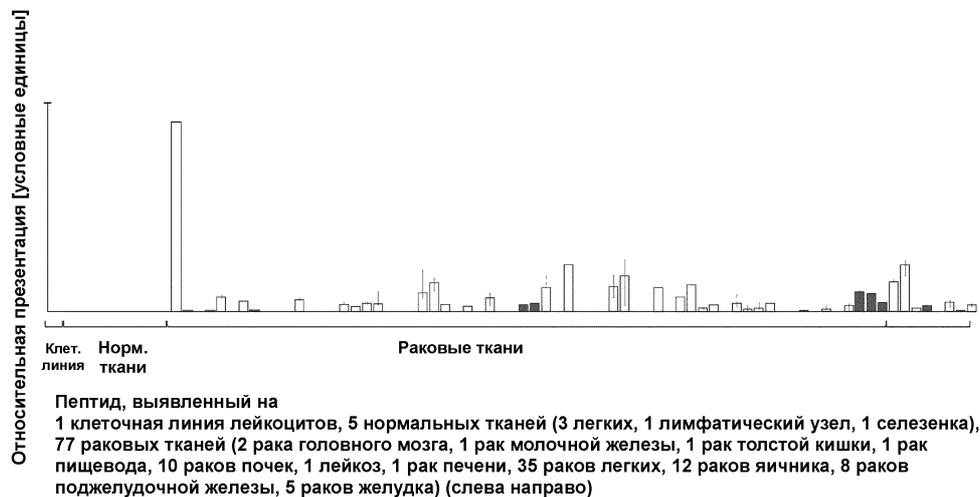
Фиг. 1С

Пептид: GLA5FK5FL (A*02)



Фиг. 1D

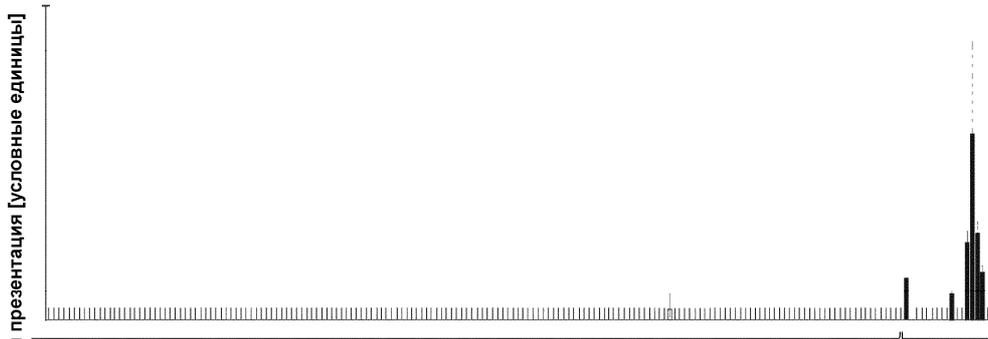
Пептид: VVDEGPTGV (A*02)



Фиг. 1E

Пептид: LLVPAHLVAA (A*02)

SEQ ID: 25



169 нормальных тканей

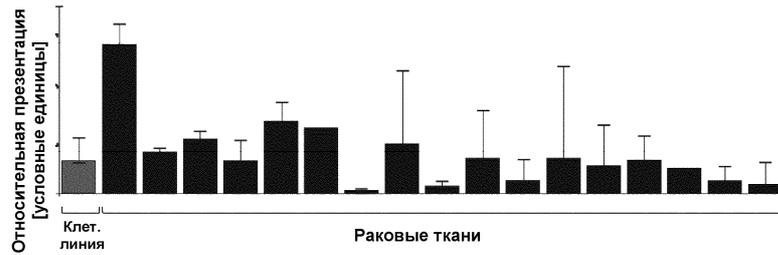
1 жировая ткань, 3 надпочечные железы, 2 артерии, 3 костных мозга, 7 головных мозгов, 3 молочных железы, 13 толстых кишок, 1 двенадцатиперстная кишка, 4 пищевода, 2 желчных пузыря, 3 сердца, 4 образца лейкоцитов, 19 печеней, 43 легких, 1 лимфатический узел, 1 яичник, 6 поджелудочных желез, 2 периферических нерва, 1 брюшина, 1 гипофиз, 3 плевры, 1 предстательная железа, 6 прямых кишок, 3 скелетные мышцы, 3 образца кожи, 2 тонких кишки, 4 селезенки, 5 желудков, 1 семенник, 2 вилочковые железы, 3 щитовидные железы, 2 матки, 2 вены, 12 почек

18
тканей
ПКК

Фиг. 1F

Пептид: ILIKHLVKV (A*02)

SEQ ID: 15



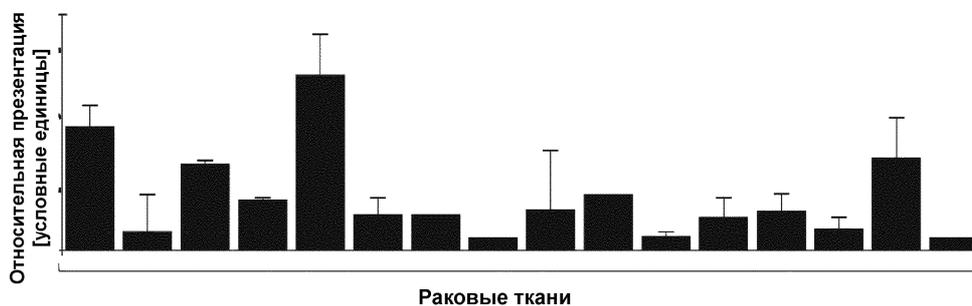
Пептид, выявленный на

1 клеточная линия (1 меланома), 17 раковых тканей (1 рак толстой кишки, 5 раков почек, 1 рак печени, 3 рака легких, 4 рака лимфатических узлов, 1 рак яичка, 2 рака матки) (слева направо)

Фиг. 1G

Пептид: FIADVVEKI (A*02)

SEQ ID: 33



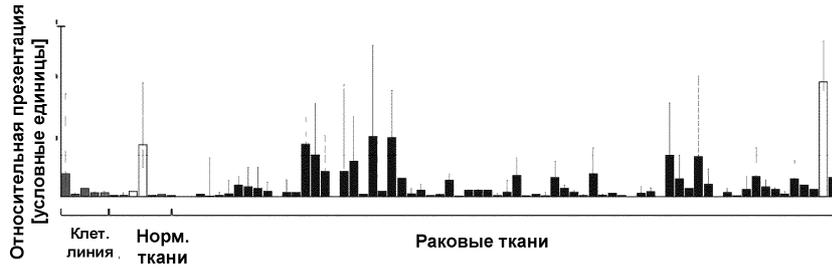
Пептид, выявленный на

16 раковых тканей (1 рак головного мозга, 1 рак молочной железы, 1 рак пищевода, 3 рака почек, 1 лейкоцитарный лейкоз, 5 раков легких, 1 рак лимфатических узлов, 2 рака яичника, 1 рак поджелудочной железы) (слева направо)

Фиг. 1H

Пептид: VLLDTILQL (A*02)

SEQ ID: 38



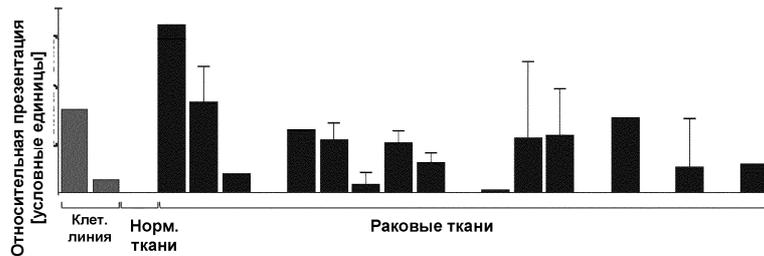
Пептид, выявленный на

1 доброкачественная ткань (рак почек), 3 клеточные линии (1 поджелудочная железа, 1 плевра, 1 предстательная железа), 1 другое заболевание (1 кожа), 9 нормальных тканей (1 легкое, 1 лимфатический узел, 2 плаценты, 1 тонкая кишка, 3 селезенки, 1 щитовидная железа), 67 раковых тканей (1 рак желчных протоков, 5 раков головного мозга, 2 рака молочной железы, 2 рака пищевода, 2 рака желчного пузыря, 4 рака почек, 7 лейкоцитарных лейкозов, 3 рака печени, 16 раков легких, 5 раков лимфатических узлов, 1 рак миелоидных клеток, 9 раков яичника, 1 рак поджелудочной железы, 1 рак прямой кишки, 5 раков кожи, 2 рака мочевого пузыря, 1 рак матки) (слева направо)

Фиг. 1I

Пептид: YLLNLNHLGL (A*02)

SEQ ID: 38



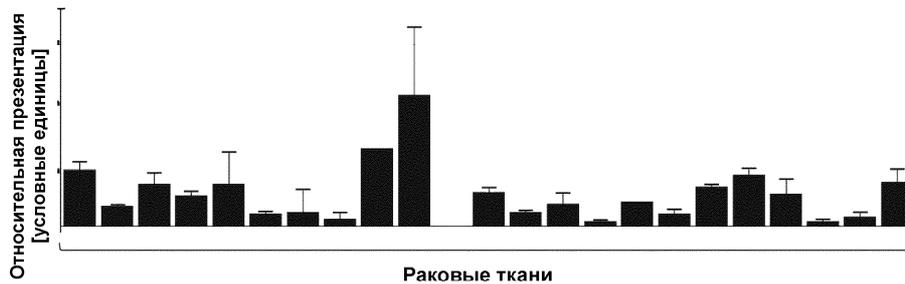
Пептид, выявленный на

2 клеточные линии (1 почка, 1 поджелудочная железа), 1 нормальная ткань (1 легкое), 19 раковых тканей (1 рак молочной железы, 2 рака почек, 3 лейкоцитарных лейкоза, 2 рака печени, 7 раков легких, 1 рак лимфатических узлов, 1 рак яичника, 1 рак прямой кишки, 1 рак мочевого пузыря) (слева направо)

Фиг. 1J

Пептид: SILDAVQRV (A*02)

SEQ ID: 52



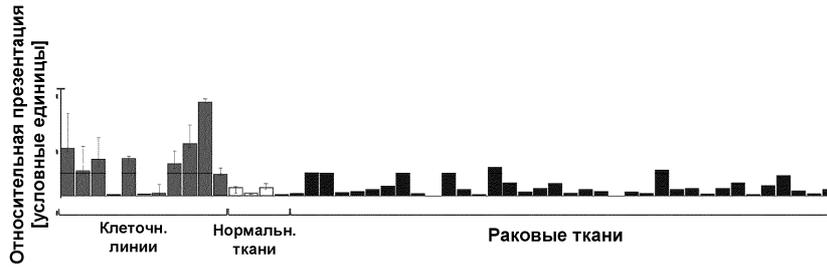
Пептид, выявленный на

23 раковые ткани (3 рака головного мозга, 4 рака молочной железы, 3 рака почек, 8 раков легких, 2 рака яичника, 1 рак поджелудочной железы, 1 рак кожи, 1 рак матки) (слева направо)

Фиг. 1K

Пептид: SLLQATDFMSL (A*02)

SEQ ID: 82

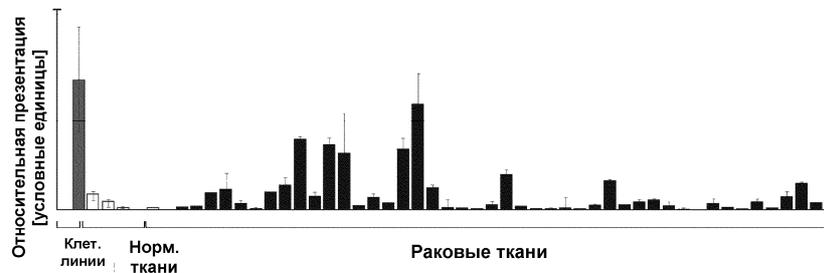


Пептид, выявленный на 11 клеточных линий (11 клеточных линий поджелудочной железы), 4 нормальные ткани (1 почка, 1 лимфатический узел, 1 плацента, 1 трахея), 36 раковых тканей (1 рак желчных протоков, 5 раков головного мозга, 3 рака молочной железы, 4 рака толстой кишки, 1 рак пищевода, 3 рака почек, 1 рак печени, 9 раков легких, 1 рак лимфатических узлов, 1 рак яичника, 2 рака поджелудочной железы, 1 рак прямой кишки, 2 рака кожи, 1 рак мочевого пузыря, 1 рак матки) (слева направо)

Фиг. 1L

Пептид: KIPPVSPSI (A*02)

SEQ ID: 98

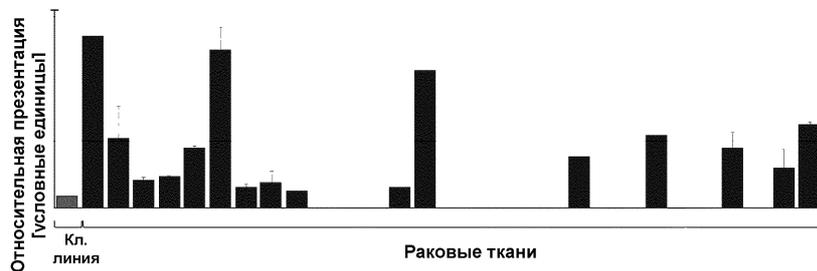


Пептид, выявленный на 2 клеточные линии (2 почки), 4 нормальные ткани (1 надпочечная железа, 1 легкое, 1 лимфатический узел, 1 плацента), 47 раковых тканей (4 рака головного мозга, 1 рак молочной железы, 1 рак пищевода, 1 рак желчного пузыря, 5 раков почек, 1 лейкоцитарный лейкоз, 5 раков печени, 12 раков легких, 2 рака лимфатических узлов, 4 рака яичника, 3 рака предстательной железы, 2 рака кожи, 6 раков матки) (слева направо)

Фиг. 1M

Пептид: KLQDGLLHI (A*02)

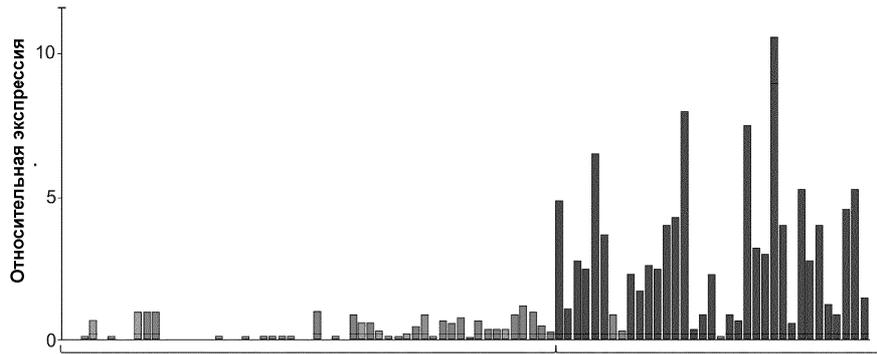
SEQ ID: 103



Пептид, выявленный на 1 клеточная линия (1 линия клеток крови), 29 раковых тканей (2 рака головного мозга, 5 раков толстой кишки, 3 рака почек, 1 рак печени, 4 рака легких, 2 рака лимфатических узлов, 3 рака яичника, 1 рак поджелудочной железы, 1 рак прямой кишки, 6 раков кожи, 1 рак яичка) (слева направо)

Фиг. 1N

Ген: GAL3ST1

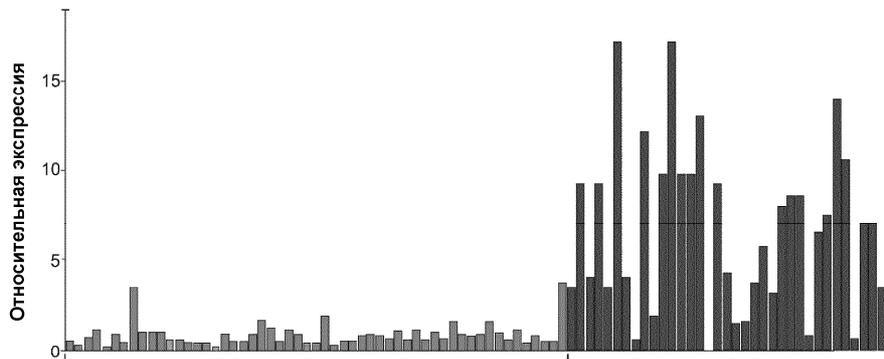


Образцы нормальной ткани (каждый образец представляет собой совокупность образцов нескольких доноров): надпочечная железа, артерия, костный мозг, головной мозг (целиком), молочная железа, толстая кишка, пищевод, сердце, почка (три повторных измерения), лейкоциты, печень, легкие, лимфатический узел, яичник, поджелудочная железа, плацента, предстательная железа, слюнная железа, скелетная мышца, кожа, тонкая кишка, селезенка, желудок, семенник, вилочковая железа, щитовидная железа, мочевой пузырь, шейка матки, матка, вена, 23 образца нормальных почек (слева направо)

35 образцов ПКК

Фиг. 2А

Ген: EGLN3

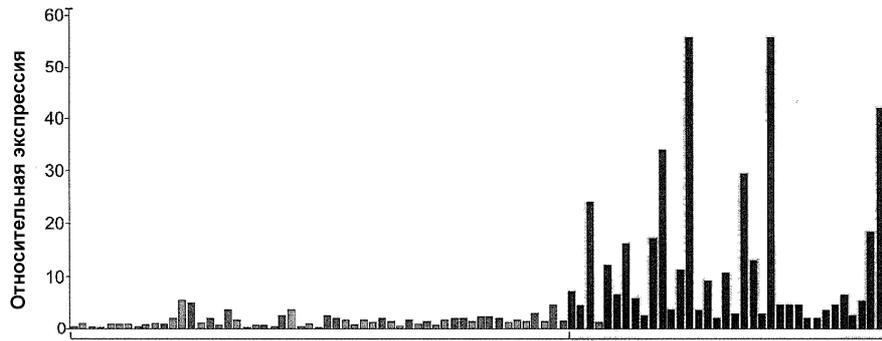


Образцы нормальной ткани (каждый образец представляет собой совокупность образцов нескольких доноров): надпочечная железа, артерия, костный мозг, головной мозг (целиком), молочная железа, толстая кишка, пищевод, сердце, почка (три повторных измерения), лейкоциты, печень, легкие, лимфатический узел, яичник, поджелудочная железа, плацента, предстательная железа, слюнная железа, скелетная мышца, кожа, тонкая кишка, селезенка, желудок, семенник, вилочковая железа, щитовидная железа, мочевой пузырь, шейка матки, матка, вена, 23 образца нормальных почек (слева направо)

35 образцов ПКК

Фиг. 2В

Ген: APOL1

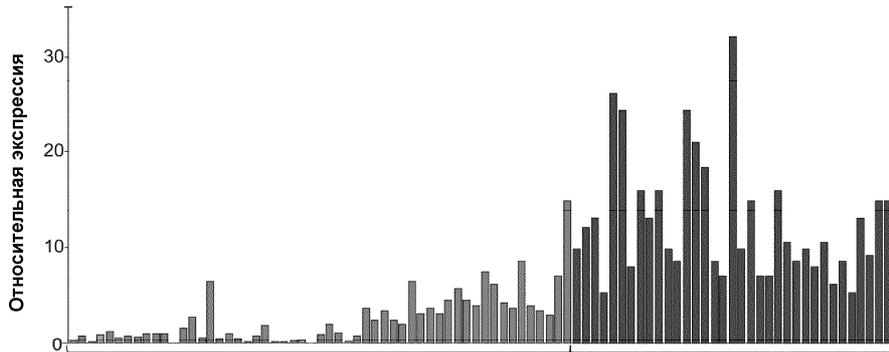


Образцы нормальной ткани (каждый образец представляет собой совокупность образцов нескольких доноров): надпочечная железа, артерия, костный мозг, головной мозг (целиком), молочная железа, толстая кишка, пищевод, сердце, почка (три повторных измерения), лейкоциты, печень, легкие, лимфатический узел, яичник, поджелудочная железа, плацента, предстательная железа, слюнная железа, скелетная мышца, кожа, тонкая кишка, селезенка, желудок, семенник, вилочковая железа, щитовидная железа, мочевого пузыря, шейка матки, матка, вена, 23 образца нормальных почек (слева направо)

35 образцов ПКК

Фиг. 2С

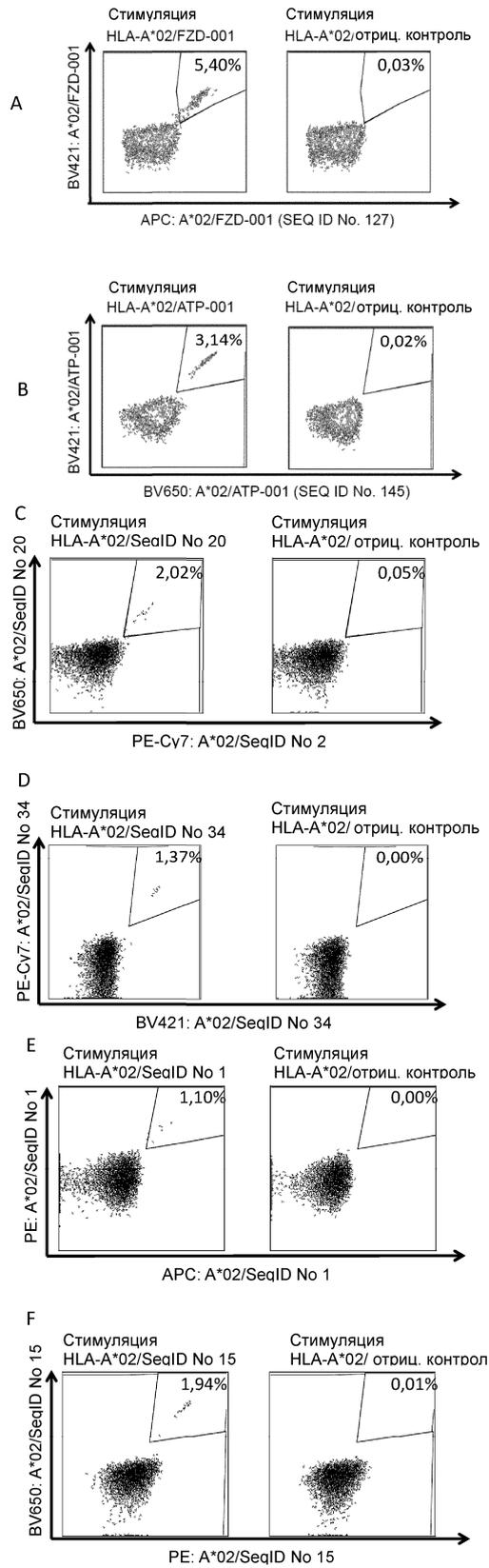
Ген: MET



Образцы нормальной ткани (каждый образец представляет собой совокупность образцов нескольких доноров): надпочечная железа, артерия, костный мозг, головной мозг (целиком), молочная железа, толстая кишка, пищевод, сердце, почка (три повторных измерения), лейкоциты, печень, легкие, лимфатический узел, яичник, поджелудочная железа, плацента, предстательная железа, слюнная железа, скелетная мышца, кожа, тонкая кишка, селезенка, желудок, семенник, вилочковая железа, щитовидная железа, мочевого пузыря, шейка матки, матка, вена, 23 образца нормальных почек (слева направо)

35 образцов ПКК

Фиг. 2D



Фиг. 3

