

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037783**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.05.20

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

(21) Номер заявки
201791853

(22) Дата подачи заявки
2016.03.17

(54) НОВЫЕ ПЕПТИДЫ И КОМБИНАЦИИ ПЕПТИДОВ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ИММУНОТЕРАПИИ РАКА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ДРУГИХ ВИДОВ РАКА

(31) 1504502.4; 62/134,253

(32) 2015.03.17

(33) GB; US

(43) 2017.12.29

(86) PCT/EP2016/055817

(87) WO 2016/146751 2016.09.22

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

(72) Изобретатель:
**Вайншенк Тони, Фритше Йенс (DE),
Сингх Харприт (US), Мар Андреа,
Отт Мартина, Вагнер Клаудиа, Шор
Оливер (DE)**

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

(56) WO-A2-2009015842
WO-A2-2011113819
WO-A2-2004050858
US-A1-2014065620
WO-A2-03010327
WO-A2-2004030615
EP-A1-1760089

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, 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.

037783
B1

037783
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 поджелудочной железы является одним из наиболее агрессивных видов и смертельно опасных видов рака в мире. В 2012 г. он занимал 12-е место среди наиболее распространенных раковых заболеваний у мужчин, насчитывая 178000 случаев заболевания, и 11-е место среди наиболее распространенных раковых заболеваний у женщин, насчитывая 160000 случаев заболевания в мире. В том же году сообщалось о 330000 смертей, позволяя раку поджелудочной железы занять седьмое место среди наиболее частых причин смерти от рака (World Cancer Report, 2014).

Рак поджелудочной железы - это не один тип заболевания, в ней можно выделить несколько различных подтипов. На долю экзокринных опухолей приходится примерно 95% всех случаев заболевания раком поджелудочной железы и сюда входят протоковые и ацинарные аденокарциномы, интрадуктальные папиллярные муцинозные опухоли (IPMN), солидные псевдопапиллярные опухоли, муцинозные кистозные аденомы и серозные цистаденомы. Оставшиеся 5% всех видов рака поджелудочной железы относятся к подгруппе нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы (World Cancer Report, 2014).

Протоковая инфильтрирующая аденокарцинома представляет собой наиболее агрессивную форму рака поджелудочной железы и в связи с ее высокой частотой встречаемости (90% всех видов рака поджелудочной железы) в эпидемиологических данных в основном отражен этот конкретный подвид (World Cancer Report, 2014).

В 2012 г. 68% всех новых случаев заболевания приходилось на развитые страны с наиболее высоким уровнем заболеваемости в Центральной и Восточной Европе, Северной Америке, Аргентине, Уругвае и Австралии. Напротив, низкий уровень заболеваемости приходится на страны Африки и Восточной Азии. Рассмотрение уровня заболеваемости в течение времени во всем мире демонстрирует достаточную стабильность для обоих полов (World Cancer Report, 2014).

В связи с отсутствием специфических симптомов рак поджелудочной железы обычно диагностируют на поздних стадиях, и часто уже присутствуют метастазы. Прогноз при постановке диагноза крайне неблагоприятный; уровень 5-летней выживаемости составляет 5%, и соотношение смертности и заболеваемости равно 0,98 (World Cancer Report, 2014).

Сообщалось о нескольких факторах, повышающих риск развития рака поджелудочной железы, включая пожилой возраст, поскольку большинство пациентов старше 65 лет в момент постановки диагноза, и расовую принадлежность, поскольку в США у чернокожего населения риск возникновения заболевания в 1,5 раза выше, чем у белого населения. Другими факторами риска являются табакокурение, ожирение, диабет, группа крови не 0 по системе АВ0, панкреатит и случаи заболевания раком поджелудочной железы в семье (World Cancer Report, 2014).

Считается, что вплоть до 10% всех случаев рака поджелудочной железы связаны с семейной наследственностью. Мутации зародышевой линии следующих генов ассоциируются с повышенным риском развития рака поджелудочной железы: p16/CDKN2A, BRCA2, PALB2, PRSS1, STK11, ATM и гены репарации ошибочно спаренных нуклеотидов. Кроме того, случаи спорадического рака поджелудочной железы также характеризуются мутациями различных онкогенов и генов-супрессоров опухоли. Наиболее распространенные мутации при протоковой аденокарциноме наблюдаются в онкогенах KRAS (95%) и AIB1 (вплоть до 60%) и генах-супрессорах опухоли TP53 (75%), p16/CDKN2A (95%) и SMAD4 (55%) (World Cancer Report, 2014).

Существует крайне мало вариантов лечения пациентов с раком поджелудочной железы. Одной существенной проблемой для эффективности лечения обычно является поздняя стадия опухоли при постановке диагноза. Кроме того, рак поджелудочной железы достаточно резистентен к химиотерапевтическим препаратам, что может быть вызвано плотностью и гиповаскуляризацией десмопластической стромы опухоли.

Согласно руководству, опубликованному Германским обществом по борьбе с раком, Германским благотворительным фондом помощи онкологическим больным (Deutsche Krebshilfe e.V) и Федеральной медицинской ассоциацией Германии, резекция опухоли является единственным имеющимся вариантом радикального лечения. Резекция рекомендуется, если опухоль ограничена поджелудочной железой, или

если метастазы имеются только в смежных органах. Резекция не рекомендуется, если имеются отдаленные метастазы опухоли. За резекцией следует адъювантная химиотерапия препаратами гемцитабин или 5-фторурацил +/-лейковорин в течение шести месяцев (S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, 2013).

Пациенты с неоперабельными опухолями на поздних стадиях могут получать лечение комбинацией химиотерапии и лучевой химиотерапии (S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, 2013).

Стандартная схема лечения при паллиативной химиотерапии - применение гемцитабина либо как монотерапии, либо в комбинации с эрлотинибом, ингибитором тирозинкиназной активности рецептора EGF. Альтернативными вариантами являются комбинация 5-фторурацила, лейковорина, иринотекана и оксалиплатина, известная также как протокол FOLFIRINOX, или гемцитабин в комбинации с напаклитакселом, которая, как было показано, давала лучшие результаты, чем монотерапия гемцитабином в рамках исследования MPACT (Von Hoff et al., 2013; S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, 2013).

Высокое соотношение смертности к заболеваемости отражает острую необходимость внедрения более эффективных стратегий лечения рака поджелудочной железы.

Таргетные виды терапии, эффективность которых уже была продемонстрирована для нескольких других видов рака, представляют собой интересный вариант. Исходя из этого, было проведено несколько клинических исследований для оценки пользы таргетных видов терапии при раке поджелудочной железы на поздних стадиях, к сожалению, они имели крайне ограниченный успех (Walker and Ko, 2014). Тем не менее, генетическое разнообразие рака поджелудочной железы может открыть возможность для проведения персонализированной терапии, так как инвазивная протоковая аденокарцинома с биаллельной инактивацией BRCA2 или PALB2, как было показано, более чувствительна к ингибиторам поли(АДФ-рибоза)полимеразы и воздействию митомицина С (World Cancer Report, 2014).

Целенаправленное воздействие на строму опухоли представляет собой альтернативный подход для разработок новых способов лечения рака поджелудочной железы. Типичное уплотнение и гиповаскуляризация стромы, возможно, действует как барьер для химиотерапевтических препаратов и, как было показано, испускает сигналы, стимулирующие пролиферацию, инвазию опухоли и сохранение раковых стволовых клеток. Таким образом, дизайн различных доклинических и клинических исследований был направлен на анализ эффективности истощения и инактивации стромы (Rucki and Zheng, 2014).

Сейчас проводятся исследования вакцинационных стратегий в качестве дальнейшей инновационной и многообещающей альтернативы для лечения рака поджелудочной железы. Вакцины на основе пептидов, мишенью которых являются мутации KRAS, активная теломераза, гастрин, сурвивин, SEA и MUC1, уже прошли оценку в клинических исследованиях, показав отчасти многообещающие результаты. Кроме того, клинические исследования вакцин на основе дендритных клеток, аллогенных ГМ-КСФ-секретирующих вакцин и препарата альгенпантусель-L у пациентов с раком поджелудочной железы выявили положительное влияние иммунотерапии. Сейчас ведутся дополнительные клинические исследования, изучающие далее эффективность различных протоколов вакцинации (Salman et al., 2013).

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 поджелудочной железы в частности. Также существует необходимость идентифицировать факторы, представляющие собой биомаркеры рака в целом и рака поджелудочной железы 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 меланоме 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 экспрессируемые 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 (опухоль-ассоциированного) экзона в случае белков с опухоль-специфическими (-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 деградации, которые могут быть опухолеспецифическими или могут не быть ими.

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

Мишенями иммунотерапии, основанной на Т-клетках, являются пептидные эпитопы, полученные из опухолеассоциированных или опухолеспецифических белков, которые презентруются молекулами главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) (МНС). Антигены, которые распознаются опухолеспецифическими Т-лимфоцитами, то есть их эпитопами, могут быть молекулами, образованными из любого класса белков, таких как ферменты, рецепторы, факторы транскрипции и т.д., которые экспрессируются и по сравнению с неизменными 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 компартов 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, презентовать пептиды экзогенных или трансмембранных белков, которые поглощаются АПК, например, во время эндоцитоза, и впоследствии процессируются.

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

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

топов МНС II класса.

T-хелперные клетки, активированные эпитопами МНС II класса, играют важную роль в управлении эффекторной функцией ЦТЛ в противоопухолевом иммунитете. Эпитопы T-хелперных клеток, инициирующие ответы T-хелперных клеток типа TH1, поддерживают эффекторные функции CD8-положительных киллерных T-клеток, которые включают цитотоксические функции, направленные против опухолевых клеток, проявляющих комплексы опухолеассоциированный пептид/МНС на их клеточной поверхности. Таким образом, опухолеассоциированные пептидные эпитопы T-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 T-лимфоцитов CD4-положительных T-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 T-клетки являются эффекторными клетками прямого противоопухолевого действия (Braumuller et al., 2013; Tran et al., 2014).

Так как конститутивная экспрессия молекул HLA II класса обычно ограничена иммунными клетками, то выделение пептидов II класса непосредственно из первичных опухолей ранее считалось невозможным. Тем не менее, Dengjel с соавторами удалось идентифицировать ряд эпитопов МНС II класса непосредственно из опухолей (WO 2007/028574, EP 1760088 B1).

Так как оба вида ответов, зависящих от CD8 и от CD4, вносят свой вклад в противоопухолевый эффект сообща и синергически, то идентификация и характеристика опухолеассоциированных антигенов, распознаваемых как CD8+ T-клетками (лиганд: молекула МНС I класса+пептидный эпитоп), так и CD4-положительными хелперными T-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 T-клетками, несущими специфические T-клеточные рецепторы (ТКР).

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

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

Поэтому антигены ТАА являются отправной точкой для разработки терапии на основе T-клеток, включающей противоопухолевые вакцины, но не ограничивающейся ими. Методы идентификации и определения характеристики ТАА обычно основаны на использовании T-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 пепти-

дов 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: 67, 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: 67, 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 67, 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 67, 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. 4 и табл. 4-2 полезны 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	Идент. номер(а) гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
1	FLAQQESEI	1211, 1212	CLTA, CLTB
2	SLQEEHVAVA	5339	PLEC
3	ALLTFMEQV	165	AEBP1
4	SVDVSPPKV	113146	AHNAK2
5	LLVDDSLHTV	253982	ASPHD1
6	VLISLKQAPLV	1211	CLTA
7	AQQESEIAGI	1211, 1212	CLTA, CLTB
8	IVDDLINL	1303	COL12A1
9	FLFDGGSANLV	1293	COL6A3
10	FLVDGSSAL	1293	COL6A3
11	FLYKIIDEL	1293	COL6A3
12	FVSEIVDTV	1293	COL6A3
13	LLAGQTYHV	1293	COL6A3
14	VLAKPGVISV	1293	COL6A3
15	SLANNVTSV	131566	DCBLD2

16	APVNVTTTEVKS	158078, 1915	EEF1A1P5, EEF1A1
17	FLKSGDAAIV	158078, 1915	EEF1A1P5, EEF1A1
18	SLLDDELMSL	26088	GGA1
19	HLAPETDEDDL	8100	IFT88
20	RLAGDGVGAV	3855	KRT7
21	HLMQPLSV	3918	LAMC2
22	TLDGAAVNQV	3918	LAMC2
23	SLSAFTLFL	4060	LUM
24	GLLEELVTV	642475	MROH6
25	SLKEEVGEEAI	4627	MYH9
26	SLKEEVGEEAIV	4627	MYH9
27	YLQGGRLDNV	6447	SCG5
28	YLQGGRLDNVV	6447	SCG5
29	FLQEYLDI	6317, 6318	SERPINB3, SERPINB4
30	VVDEGPTGV	9123	SLC16A3
31	SLAAAAGKQEL	6750	SST
32	SLAAAAGKQELA	6750	SST
33	SLDSRLELA	81628	TSC22D4
34	MLMPVHFL	114131	UCN3
35	VMDSGDGVTHTV	100996820, 344227, 345651, 440915, 445582, 60, 641455, 653269, 653781, 71, 728378	ACTBL2, POTEKP, POTEI, POTEJ, ACTB, POTEM, POTEI, POTEJ, ACTG1, POTEF
36	KQEYDESGPSIVH	100996820, 344227, 440915, 445582, 60, 641455, 653269, 653781, 71, 728378	POTEKP, POTEI, POTEJ, ACTB, POTEM, POTEI, POTEJ, ACTG1, POTEF
37	GLLKKINSV	55107	ANO1
38	NLVEKTPALV	10632, 267020	ATP5L, ATP5L2
39	TLLSNEEA	1191	CLU
40	FILDSAETTTL	1293	COL6A3
41	FLLDGSEGV	1293	COL6A3
42	KLVDKSTEL	1293	COL6A3
43	RLDQRPQI	1293	COL6A3
44	VLLDKIKNLQV	1293	COL6A3
45	VADKIHVS	11072	DUSP14
46	TFAPVNVTTTEVKS	158078, 1915	EEF1A1P5, EEF1A1
47	KMDASLGNLFA	10447, 51384	FAM3C, WNT16
48	ALTQTGGPHV	2316	FLNA
49	NLKGTFATL	100187828, 3043, 3045	HBB, HBD
50	ALAAITRL	80201	HKDC1
51	ALMLQGVDL	3329	HSPD1
52	RMVEEIGVEL	10525	HYOU1
53	SSFGLGGGSV	3880	KRT19
54	VLLSEIEVA	4134	MAP4
55	YLDAMMNEA	103910, 10627	MYL12B, MYL12A
56	GLLDYATGAIQSV	117583	PAR3B
57	FLGKVIDV	100271927, 10156	RASA4B, RASA4
58	GLAAFKAF	5999	RGS4
59	KLFNLSKEDDV	6194	RPS6
60	YLEEDVYQL	23255	SOGA2
61	ALEKDYEEVGV	10376, 113457, 7278, 7846	TUBA1B, TUBA3D, TUBA3C, TUBA1A
62	ALEKDYEEV	10376, 113457, 51807, 7277, 7278, 7846, 84790	TUBA1B, TUBA3D, TUBA8, TUBA4A, TUBA3C, TUBA1A, TUBA1C
63	FAGDDAPR	100996820, 344227, 445582, 58, 59, 60, 653269, 653781, 70, 71, 72, 728378	POTEI, ACTA1, ACTA2, ACTB, POTEI, POTEJ, ACTC1, ACTG1, ACTG2, POTEF
64	FLVSNMLLAEA	113791	PIK3IP1

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

SEQ No.	ID	Последовательность	Идент. номер(а) гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
65		YLYDSETKNA	4316	MMP7
66		ALLSGLREA	23028	KDM1A
67		KMFFLIDKV	4599	MX1

Таблица 3

Пептиды, полезные, например, для персонализированной противораковой терапии

SEQ No.	ID	Последовательность	Идент. номер(а) гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
68		KLLTEVHAA	101	ADAM8
69		VMAPTMTI	338	APOB
70		FLVDGSWSV	1303	COL12A1
71		FLLDGSANV	1293	COL6A3
72		YVYQNNIYL	2191	FAP
73		TLVAIVGV	60681	FKBP10
74		KIQEILTQV	10643	IGF2BP3
75		RLDDLKMTV	3918	LAMC2
76		RLDVSRL	3918	LAMC2
77		GLTDNIHLV	25878	MXRA5
78		TLSSIKVEV	25878	MXRA5
79		VLAPRVLRA	5954	RCN1
80		TYPHTSQV	1462	VCAN
81		AMSSKFFLV	7474	WNT5A
82		SISDVIAQV	56172	ANKH
83		FLIDSSEGV	1293	COL6A3
84		NLLLDLYEL	1293	COL6A3
85		TVAEVIQSV	55083	KIF26B
86		SLLAQNTSWLL	7070	THY1
87		LLLGPAAA	23544	SEZ6L

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 почек, рак головного мозга, рак толстой кишки или прямой кишки, рак пищевода, рак молочной железы, рак яичника, рак желудка, рак печени, рак предстательной железы, меланомы и лейкозы.

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: 67. Более предпочтительными являются пептиды - в отдельности или в комбинации - выбранные из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 34 (см. табл. 1), и их применение в иммунотерапии рака поджелудочной железы, рака легких, рака почек, рака головного мозга, рака толстой кишки или прямой кишки, рака пищевода, рака молочной железы, рака яичника, рака желудка, рака печени, рака предстательной железы, меланомы и лейкозов и предпочтительно рака поджелудочной железы. Как показано в последующих табл. 4 и 4-2, 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. 1 и пример 1).

Таблица 4

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
3	ALLTFMEQV	Легкие, почки, головной мозг, толстая кишка, прямая кишка, печень
4	SVDVSPPKV	Легкие, почки, меланома
5	LLVDDSFHTV	Почки, головной мозг, печень, меланома, яичник
8	IVDDLINL	Пищевод
9	FLFDGSANLV	Легкие, толстая кишка, прямая кишка, молочная железа, пищевод
10	FLVDGSSAL	Легкие, желудок, молочная железа
11	FLYKIIDEL	Легкие, толстая кишка, прямая кишка, молочная железа
12	FVSEIVDTV	Легкие, молочная железа, пищевод
14	VLAKPGVISV	Легкие
15	SLANNVTSV	Легкие, почки, головной мозг, желудок, меланома, яичник, пищевод
16	APVNVTEVKSV	Лейкоциты
21	HLMDQPLSV	Легкие
23	SLSAFTLFL	Легкие, предстательная железа

24	GLLEELVTV	Легкие, желудок, яичник
30	VVDEGPTGV	Легкие, почки, головной мозг, желудок, печень, лейкоциты, молочная железа, яичник
34	MLMPVHFL	Желудок
36	KQEYDESGPSIVH	Легкие, головной мозг
39	TLLSNLEEA	Головной мозг, предстательная железа
40	FILDSAETTTL	Легкие
41	FLLDGSEGV	Легкие, молочная железа, яичник, пищевод
42	KLVDKSTEL	Легкие, толстая кишка, прямая кишка, пищевод
43	RLDQRPQI	Легкие, толстая кишка, прямая кишка, молочная железа, пищевод
44	VLLDKIKNLQV	Легкие, желудок, толстая кишка, прямая кишка, печень, молочная железа, меланома
45	VADKIHSV	Почки, желудок
47	KMDASLGNLFA	Головной мозг
50	ALAAILTRL	Почки, желудок, толстая кишка, прямая кишка
51	ALMLQGVDL	Пищевод
53	SSFGGLGGGSV	Легкие
55	YLDAMMNEA	Головной мозг, толстая кишка, прямая кишка, печень, яичник
58	GLAAFKAFL	Легкие, почки, печень
60	YLEEDVYQL	Легкие, почки, толстая кишка, прямая кишка, молочная железа
64	FLVSNMLLAEA	Предстательная железа
65	YLYDSETKNA	Почки, толстая кишка, прямая кишка, печень, яичник, пищевод
66	ALLSGLREA	Почки, лейкоциты, меланома
67	KMFFLIDKV	Головной мозг, печень
68	KLLTEVHAA	Легкие, почки, желудок, толстая кишка, прямая кишка, печень, молочная железа, меланома
69	VMAPFTMTI	Легкие, печень, предстательная железа, яичник, пищевод
70	FLVDGSWSV	Легкие, желудок, толстая кишка, прямая кишка, яичник, пищевод
71	FLLDGSANV	Легкие, желудок, толстая кишка, прямая кишка, печень, молочная железа, яичник, пищевод
72	YVYQNNIYL	Легкие, желудок, толстая кишка, прямая кишка, печень, молочная железа, меланома, яичник, пищевод
73	TLVAIVGV	Легкие, почки, головной мозг, желудок, толстая кишка, прямая кишка, печень, предстательная железа, молочная железа, яичник, пищевод
74	KIQEILTQV	Легкие, почки, головной мозг, желудок, толстая кишка, прямая кишка, печень, лейкоциты, яичник, пищевод
75	RLDDLKMTV	Легкие, почки, толстая кишка, прямая кишка, яичник, пищевод
76	RLLDSVSRL	Легкие, почки, толстая кишка, прямая кишка, печень, яичник
77	GLTDNIHLV	Легкие, почки, толстая кишка, прямая кишка, яичник, пищевод
78	TLSSIKVEV	Легкие, почки, желудок, толстая кишка, прямая кишка, предстательная железа, молочная железа, меланома
79	VLAPRVLRA	Легкие, почки, головной мозг, толстая кишка, прямая кишка, печень
81	AMSSKFFLV	Легкие, головной мозг, желудок, толстая кишка, прямая кишка, печень, предстательная железа, пищевод
82	SISDVIAQV	Легкие, головной мозг, толстая кишка, прямая кишка, печень, предстательная железа
83	FLIDSSEGV	Легкие, толстая кишка, прямая кишка, молочная железа, яичник, пищевод
84	NLLDLDYEL	Легкие, желудок, толстая кишка, прямая кишка, молочная железа, яичник, пищевод
85	TVAEVIQSV	Легкие, пищевод
86	SLLAQTSWLL	Легкие, почки, головной мозг, желудок, толстая кишка, прямая кишка, печень, меланома
87	LLLGSPAAA	Головной мозг

Для выбранных пептидов таблица демонстрирует, на каких дополнительных видах опухолей они были обнаружены и имели избыточную презентацию на не менее чем 5% исследованных опухолевых образцов или 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 4-2

Пептиды в соответствии с настоящим изобретением и их конкретное применение при других пролиферативных заболеваниях, в особенности при других раковых заболеваниях (поправка к табл. 4)

SEQ ID No.	Последовательность	Дополнительные виды
3	ALLTFMEQV	МРЛ, РМЖ, меланома, рак мочевого пузыря, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
4	SVDVSPPKV	Меланома, рак пищевода
5	LLVDDSLHTV	МРЛ, РМЖ, меланома, рак пищевода, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
6	VLISLKQAPLV	РМЖ, рак мочевого пузыря, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
8	IVDDLINL	НМРЛ, РЖ, меланома, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, НХЛ
9	FLFDGSANLV	МРЛ, меланома, РЯ, рак мочевого пузыря, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
10	FLVDGSSAL	МРЛ, КРК, меланома, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
11	FLYKIIDL	МРЛ, меланома, рак мочевого пузыря, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
12	FVSEIVDTV	МРЛ, РЖ, КРК, рак мочевого пузыря, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
13	LLAGQTYHV	НМРЛ, РМЖ, РЯ, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
14	VLAQPGVISV	РМЖ, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
15	SLANNVTSV	Рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
16	APVNVTTTEVKS SV	ОМЛ
19	HLAPETDEDDL	Рак желчного пузыря, рак желчных протоков
20	RLAGDGVGAV	Рак мочевого пузыря
21	HLMDQPLSV	РЯ, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
22	TLDGAAVNQV	Рак пищевода, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
23	SLSAFTLFL	МРЛ, РМЖ, меланома, РЯ, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, НХЛ
24	GLLEELVTV	МРЛ, КРК, РМЖ, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
29	FLQEYLDAL	Рак мочевого пузыря
30	VVDEGPTGV	МРЛ, КРК, меланома, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, НХЛ
34	MLMPVHFLL	РМЖ
37	GLLKKINSV	РМЖ, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, РЯ
38	NLVEKTPALV	ОМЛ
39	TLLSNLEEA	Рак мочевого пузыря, рак матки, НХЛ
40	FILDSAETTL	МРЛ, РМЖ, РЯ, рак пищевода
41	FLLDGSEGV	МРЛ, меланома, рак мочевого пузыря, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
42	KLVDKSTEL	МРЛ, РМЖ, меланома, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
43	RLDQRVPQI	МРЛ, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
44	VLLDKIKNLQV	МРЛ, РЯ, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, НХЛ
45	VADKIHSV	РМЖ, меланома, рак пищевода, рак мочевого пузыря
46	TFAPVNVVTE VKSV	Рак желчного пузыря, рак желчных протоков
47	KMDASLGNLFA	Рак пищевода, рак мочевого пузыря
50	ALAAAILTRL	Рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
51	ALMLQGVDL	РМЖ
53	SSFGLGGGS V	РМЖ
54	VLLSEIEVA	Меланома, рак матки
55	YLDAMMNEA	РПРЖ, меланома, рак мочевого пузыря, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
58	GLAAFKAFL	МРЛ, РМЖ, меланома, РЯ, рак пищевода, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, НХЛ, РЯ
60	YLEEDVYQL	Меланома, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, НХЛ
64	FLVSNMLLAE A	Рак мочевого пузыря
65	YLYDSETKNA	МРЛ, РМЖ, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
66	ALLSGLREA	РЖ, РМЖ
67	KMFFLIDKV	РМЖ, меланома, РЯ, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, НХЛ, РЯ

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, РМЖ - рак молочной железы, ККМ - карцинома клеток Меркеля, РЯ - рак яичника, НХЛ - неходжкинская лимфома, ОМЛ - острый миелоидный лейкоз, ХЛЛ - хронический лимфоцитарный лейкоз.

Для выбранных пептидов таблица демонстрирует, как и табл. 4, 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, желчного пузыря, сердца, почек, толстой кишки, печени, легких, лимфатических узлов, нервная ткань, ткань поджелудочной железы, парашитовидной железы, брюшины, гипофиза, плевры, слюнной железы, скелетных мышц, кожа, ткань тонкого кишечника, селезенки, желудка, вилочковой железы, щитовидной железы, трахеи, мочеточника и мочевого пузыря.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению, выбранного из последовательностей с SEQ ID NO: 3, 4, 9, 10, 16, 11, 12, 14, 15, 21, 23, 24, 30, 36, 40, 41, 42, 43, 44, 50, 53, 58, 60, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 81, 82, 83, 84, 85 и 86 - 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, выбранного из последовательностей с SEQ ID NO: 3, 4, 5, 15, 30, 45, 50, 58, 60, 65, 66, 68, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 и 86 - в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации - для лечения рака почек.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению, выбранного из последовательностей с SEQ ID NO: 3, 5, 15, 30, 36, 39, 47, 55, 67, 73, 74, 79, 81, 82, 86 и 87 - 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, выбранного из последовательностей с SEQ ID NO: 3, 9, 11, 42, 43, 44, 50, 55, 60, 65, 68, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 81, 82, 83, 84 и 86 - в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации - для лечения рака толстой кишки.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению, выбранного из последовательностей с SEQ ID NO: 3, 9, 11, 42, 43, 44, 50, 55, 60, 65, 68, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 81, 82, 83, 84 и 86 - в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации - для лечения рака прямой кишки.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению, выбранного из последовательностей с SEQ ID NO: 3, 8, 9, 12, 15, 41, 42, 43, 51, 65, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 77, 81, 83, 84 и 85 - в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации - для лечения рака пищевода.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению, выбранного из последовательностей с SEQ ID NO 4, 5, 15, 44, 66, 72, 78 и 86 - 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, выбранного из последовательностей с SEQ ID NO: 5, 15, 24, 30, 41, 55, 65, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 83 и 84 - 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, выбранного из последовательностей с SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 41, 43, 60, 71, 72, 73, 78, 83 и 84 - 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, выбранного из последовательностей с SEQ ID NO: 5, 30, 44, 55, 58, 65, 67, 68, 69, 71, 72, 73, 74, 76, 79, 81, 82, 85 и 86 - 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, выбранного из последовательностей с SEQ ID NO: 10, 15, 24, 30, 34, 44, 45, 50, 68, 70, 71, 72, 73, 74, 78, 81, 84 и 86 - 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, выбранного из последовательностей с SEQ ID NO: 23, 39, 64, 69, 73, 78, 81 и 82 - 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, выбранного из последовательностей с SEQ ID NO: 16, 30,

66 и 74 - в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации - для лечения лейкоза.

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: 67.

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 антигенассоциированной инвариантной цепи (Ii), или слитого с антителом (или встроенный в последовательность), таким как, например, антителом, специфичным для дендритных клеток.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Настоящее изобретение далее относится к способу в соответствии с настоящим изобретением, где антигенпрезентирующая клетка включает вектор экспрессии, способный экспрессировать или экспрессирующий указанный пептид, содержащий последовательность с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 67, предпочтительно содержащий SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 34 или его вариантную аминокислотную последовательность.

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

Настоящее изобретение далее относится к способу уничтожения клеток-мишеней у пациента, чьи клетки-мишени 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, белком или основан на растворимом ТКР или антителе.

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

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

Как терапевтические способы применения против других видов раковых заболеваний, так и диагностическое применение раскрыты в последующем более подробном описании продуктов экспрессии (полипептидов), лежащих в основе пептидов в соответствии с изобретением.

Ген АСАТ2 кодирует ацетил-СоА ацетилтрансферазу 2, тиолазу, задействованную в метаболизме жиров. Уровень экспрессии АСАТ2 повышен при гепатоклеточной карциноме (Song et al., 2006). Экспрессия АСАТ2 ассоциируется с резистентностью клеточных линий рака поджелудочной железы к лучевой терапии (Soucek et al., 2014).

Ген АСТА1 кодирует альфа-актин скелетных мышц, члена семейства белков актина, которые являются высококонсервативными белками, играющими роль в подвижности, образовании структуры и целостности клеток. АСТА1, классический миоэпителиальный маркер, как было показано, экспрессируется в высокой степени в ассоциированных с опухолью фибробластах при раке мочевого пузыря, плоскоклеточной карциноме полости рта, инвазивном раке молочной железы, раке желудка, холангиокарциноме и метастатической карциноме печени и вносит свой вклад в эпителиально-мезенхимальный переход, образование стромы опухоли и фиброз (Schulte et al., 2012; Franz et al., 2010; Kuroda et al., 2005; Nakayama et al., 2002; Terada et al., 1996).

Ген АСТА2 кодирует альфа-актин гладких мышц, члена семейства белков актина, которые являются высококонсервативными белками, играющими роль в подвижности, образовании структуры и целостности клеток (RefSeq, 2002). Однонуклеотидные полиморфизмы или вариации числа копий АСТА2 были идентифицированы в клетках хронического лимфоцитарного лейкоза, в метастазах в головной мозг мелкоклеточного рака легких и в клеточных линиях, полученных из метастатической меланомы (Berndt et al., 2013; Lee et al., 2012; Dutton-Regester et al., 2012). В функциональном смысле высокие уровни экспрессии АСТА2, видимо, ассоциируются с повышенной инвазией опухолевых клеток и образованием метастазов (Kojima et al., 2014; Lee et al., 2013b; Tatenhorst et al., 2004).

Ген АСТВ кодирует бета-актин, основное составляющее сократительного аппарата и один из двух немышечных цитоскелетных актинов (RefSeq, 2002). Как было показано, регуляция экспрессии АСТВ нарушена при раке печени, меланоме, раке почек, колоректальном раке, раке желудка, раке поджелудочной железы, раке пищевода, раке легких, раке молочной железы, раке предстательной железы, раке яичника, лейкозе и лимфоме. Аномальная экспрессия и полимеризация АСТВ и вызванные изменения в цитоскелете, скорее всего, ассоциируются с инвазивностью и метастазированием рака (Guo et al., 2013).

Ген АСТВL2 кодирует каппа-актин, члена семейства белков актинов, которые являются высококонсервативными белками, играющими роль в подвижности, образовании структуры и целостности клеток (RefSeq, 2002). Повышенный уровень экспрессии АСТВL2 наблюдался в клетках гепатоклеточной карциномы и гепатомы, где он изменял ростовые свойства клеток и вносил свой вклад в неблагоприятный прогноз на послеоперационный период (Chang et al., 2006; Chang et al., 2011).

Ген АСТС1 кодирует альфа-актин 1 сердечной мышцы, который является основным составляющим сократительного аппарата сердечных миоцитов (RefSeq, 2002). Об изменениях экспрессии АСТС1 сообщалось для рака мочевого пузыря, мелкоклеточного рака легких после лечения паклитакселом и химиорезистентной формы рака яичника (Zaravinos et al., 2011; Che et al., 2013; Pan et al., 2009). Кроме того, АСТС1 мог бы быть полезным диагностическим маркером рака предстательной железы и рабдомиосаркомы (Huang et al., 2010; Clement et al., 2003).

Ген АСТG1 кодирует гамма-актин 1, цитоплазматический актин, обнаруженный в немышечных клетках, который является основой клеточной подвижности (RefSeq, 2002). Как было продемонстриро-

вано, ACTG1 избыточно экспрессируется при мелкоклеточном раке легких и остеосаркоме, и его уровень понижен в клетках эпителиального рака яичника (Li et al., 2010; Jeong et al., 2011; Chow et al., 2010). Об изменениях уровня ACTG1 сообщалось, что они способствуют инвазии и образованию метастазов в различных видах раковых клеток. В клетках рака толстой кишки и гепатоклеточной карциномы избыточная экспрессия ACTG1 усиливает миграцию и инвазию, тогда как в клетках меланомы и аденокарциномы слюнной железы пониженный уровень ACTG1 ассоциируется с этим фенотипом (Simiczujew et al., 2014; Luo et al., 2014; Zhang et al., 2006; Gutgemann et al., 2001; Suzuki et al., 1998).

Ген ACTG2 кодирует гамма-актин 2; актин гладких мышц, обнаруженный в кишечной ткани, являющийся основой клеточной подвижности (RefSeq, 2002). Обсуждается возможность использования ACTG2 в качестве потенциального биомаркера при диагностике рака предстательной железы и, как было показано, его уровень повышен в трансдифференцированных стромальных клетках предстательной железы (Fillmore et al., 2014; Untergasser et al., 2005). В отношении химиотерапии уровень экспрессии ACTG2 повышается после обработки паклитакселом клеток рака гортани, скорее всего, он задействован в развитии резистентности к цисплатину клеток рака молочной железы и, как было показано, положительно коррелирует с чувствительностью колоректального рака с метастазами в печень к схеме лечения FOLFOX4 (Xu et al., 2013; Watson et al., 2007; Lu et al., 2013b).

Ген ADAM8 кодирует домен 8 металлопептидазы ADAM, члена семейства доменов дезинтегрин и металлопротеазы, который участвует в межклеточных взаимодействиях и взаимодействиях между клетками и матриксом (RefSeq, 2002). 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).

Ген AEBP1 кодирует энхансерсвязывающий белок адипоцитов 1, карбоксипептидазу А, которая может выполнять функцию корепрессора транскрипции с важной ролью при адипогенезе и дифференциации клеток гладких мышц (RefSeq, 2002). Уровень AEBP1 повышен при меланоме, и это вносит свой вклад в приобретение резистентности к ингибированию мутантного гомолога В1 вирусного онкогена мышинной саркомы *v-rat* (Hu et al., 2013). Экспрессия AEBP1 повышена в большинстве первичных глиобластом (Reddy et al., 2008).

Ген ANNAK2 кодирует каркасный белок ANNAK нуклеопротеин 2 (Marg et al., 2010). ANNAK2 является важным элементом неклассического пути секреции фактора роста фибробластов 1 (FGF1), фактора, который задействован в росте и инвазии опухоли (Kirov et al., 2015).

Ген ANKH кодирует гомолог белка прогрессирующего анкилоза (мышьи)/регулятор транспорта неорганического пирофосфата ANKH, являющегося многопроходным трансмембранным белком, который контролирует уровни пирофосфата (RefSeq, 2002).

Ген ANO1 кодирует аноктамин 1, активируемый кальцием хлоридный канал, ассоциированный с саркомой тонкой кишки и раком полости рта (RefSeq, 2002). ANO1 амплифицирован при плоскоклеточном раке пищевода (ПлККП), гастроинтестинальной стромальной опухоли (ГИСО), плоскоклеточной карциноме головы и шеи (ПлККГШ), раке поджелудочной железы и молочной железы (Qu et al., 2014).

Ген APOB кодирует аполипопротеин В, основной аполипопротеин хиломикрон и липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) (RefSeq, 2002). Было обнаружено, что в клетках альфа-фетопротеин-негативной ГМК, связанной с гепатитом В, APOB является одним из 14 дифференциально экспрессируемых белков, которые могут быть ассоциированы с прогрессией ГМК (He et al., 2014). При распространенном раке молочной железы было обнаружено, что APOB является одним из 6 дифференциально экспрессируемых белков, которые могут предсказывать восприимчивость к неoadьювантной химиотерапии и безрецидивную выживаемость пациентов (Hyung et al., 2011).

Ген ASPHD1 кодирует белок 1, содержащий домен аспартат-бета-гидроксилазы. ASPHD1 локализован на хромосоме 16p11.2 (RefSeq, 2002).

Ген ATM кодирует характерную для заболевания атаксией телеангиэктазией мутантную форму члена семейства PI3/PI4-киназ и главного контроллера сигнальных путей контрольной точки клеточного цикла, которые необходимы для ответа клетки на повреждение ДНК и стабильности генома (RefSeq, 2002). ATM является опухолевым супрессором, который часто имеет мутации в широком спектре раковых опухолей человека, в том числе при раке легких, колоректальном раке, раке молочной железы и видах рака кроветворной системы (Weber and Ryan, 2014).

Ген ATP5B кодирует митохондриальный комплекс АТФ-синтазы (комплекс F1), транспортирующий H⁺, бета-полипептид, бета-субъединицу каталитического центра митохондриальной АТФ-синтазы (RefSeq, 2002). Экспрессия гена ATP5B была существенно выше в тканях колоректального рака по сравнению с нормальными тканями (Geyik et al., 2014). Пониженный уровень экспрессии ATP5B в опухолевых тканях тесно связан с метастазами, инвазией и неблагоприятным прогнозом при раке желчного пузыря (Sun et al., 2015b).

Ген ATP5L кодирует митохондриальный комплекс АТФ-синтазы (комплекс Fo), транспортирующий H⁺, субъединицу G компонента митохондриальной АТФ-синтазы, пронизывающий мембрану, кото-

рый включает протонный канал (RefSeq, 2002).

Ген ATP5L2 кодирует митохондриальный комплекс АТФ-синтазы (комплекс Fo), транспортирующий H⁺, субъединицу G2 компонента митохондриальной АТФ-синтазы, пронизывающий мембрану, который включает протонный канал (RefSeq, 2002).

Ген BACE2 кодирует APP-расщепляющий фермент 2 бета-секретазы, интегральный мембранный гликопротеин и аспартамовую протеазу. BACE2 расщепляет белок-предшественник бета-амилоида до бета-амилоидного пептида (RefSeq, 2002). BACE2 задействован в функциях бета-клеток поджелудочной железы (Vassar et al., 2014).

Ген CCNB1 кодирует циклин B1, регуляторный белок, задействованный в митозе (RefSeq, 2002). CCNB1 - это хорошо изученный опухолевый антиген, и избыточную экспрессию CCNB1 описывали для рака молочной железы, головы и шеи, предстательной железы, колоректального рака, раке легких и печени (Egloff et al., 2006).

Ген CEACAM6 кодирует молекулу клеточной адгезии 6, связанную с раковоэмбриональным антигеном (неспецифичный перекрестно реагирующий антиген), члена семейства CEACAM опухолевых маркеров (RefSeq, 2002). Уровень CEACAM6 повышен при раке желудка (Yasui et al., 2004). CEACAM6 является кандидатом в антигены опухоли молочной железы (Sood, 2010).

Ген CLTA кодирует клатрин, легкую цепь А, структурный компонент ямок, окаймленных клатрином, с регуляторной функцией (RefSeq, 2002). Ген CLTA демонстрирует картину альтернативного сплайсинга при глиоме (Cheung et al., 2008).

Ген CTLB кодирует клатрин, легкую цепь В, структурный компонент ямок, окаймленных клатрином, с регуляторной функцией (RefSeq, 2002).

Ген CLU кодирует секретируемый шаперон, который, возможно, участвует в нескольких основополагающих биологических процессах, таких как гибель клетки, прогрессирование опухоли и развитие нейродегенеративных нарушений (RefSeq, 2002). Его роль в онкогенезе, скорее всего, носит амбивалентный характер, поскольку в нормальных клетках и во время ранних стадий онкогенеза CLU, возможно, ингибирует опухолевую прогрессию, тогда как в случае распространенной неоплазии он может представлять собой значительное преимущество для опухоли, подавляя множество терапевтических факторов стресса и усиливая метастазирование. CLU, как было показано, играет важнейшую роль в патогенезе рака предстательной железы, регулирует агрессивное поведение клеток светлоклеточной гепатоклеточной карциномы, модулируя сигнальный путь ERK1/2 и экспрессию MMP-9, и придает резистентность к лечению на поздних стадиях рака легких (Trogakos, 2013; Panico et al., 2009; Takeuchi et al., 2014; Wang et al., 2014b).

Ген COL12A1 кодирует альфа-цепь коллагена типа XII, члена семейства коллагенов FACIT (ассоциированные с фибриллами коллагены с прерываемыми тройными спиральями) и, таким образом, является частью внеклеточного матрикса (ECM) (RefSeq, 2002). COL12A1 экспрессируется в избытке в вариантах клеточных линий рака яичника с резистентностью к лекарственным средствам (Januchowski et al., 2014). При колоректальном раке COL12A1 избыточно экспрессируется в десмопластической строме и вокруг фибробластов, ассоциированных с раком, а также в раковых клетках, выстилающих границы инвазии (Karagiannis et al., 2012).

Ген COL6A3 кодирует цепь альфа-3 коллагена VI типа, коллагена, формирующего филаменты-бусины, представленного в большинстве соединительных тканей и играющего важную роль в организации компонентов матрикса (RefSeq, 2002). Уровень экспрессии COL6A3, как сообщалось, повышен при раке поджелудочной железы, раке толстой кишки, раке желудка, слизеобразующем плоскоклеточном раке и раке яичника. Варианты транскриптов, ассоциированные с раком, включая экзоны 3, 4 и 6, были обнаружены в клетках рака толстой кишки, рака мочевого пузыря, предстательной железы и рака поджелудочной железы (Arafat et al., 2011; Smith et al., 2009; Yang et al., 2007; Xie et al., 2014; Leivo et al., 2005; Sherman-Baust et al., 2003; Gardina et al., 2006; Thorsen et al., 2008). При раке яичника уровни COL6A3 коррелировали с более высокой степенью злокачественности, а при раке поджелудочной железы, как было продемонстрировано, COL6A3 представлял собой подходящий диагностический биомаркер сыворотки (Sherman-Baust et al., 2003; Kang et al., 2014).

Ген DCBLD2 кодирует дискоидин, белок 2, содержащий домены CUB и LCCL, имеющий также название нейропиплинподобный эндотелиальный и образованный из клеток гладких мышц трансмембранный корцепторный белок (RefSeq, 2002). 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 высокометастатического рака легких (Koshikawa et al., 2002). Напротив, экспрессия DCBLD2 подавлена при гиперметилировании его промотора при раке желудка (Kim et al., 2008).

Ген DUSP14, биспецифичная фосфатаза 14, может дефосфорилировать остатки тирозина, а также серина/треонина и играет роль в деактивации сигнального пути MAP-киназы (RefSeq, 2002). Однонуклеотидные полиморфизмы в гене DUSP14 ассоциируются с изменением риска возникновения меланомы (Yang et al., 2014a; Liu et al., 2013a).

Ген EEF1A1 кодирует изоформу альфа-субъединицы комплекса фактора элонгации-1, который от-

вечает за ферментативную доставку аминоксил-тРНК в рибосому (RefSeq, 2002). Как было показано, уровень EEF1A1 повышен при многих видах рака, в том числе колоректальном раке, раке яичника, раке желудка, раке предстательной железы, глиобластоме и плоскоклеточной карциноме, и он был описан в качестве потенциального сывороточного биомаркера рака предстательной железы (Matassa et al., 2013; Vui-Kee et al., 2012; Lim et al., 2011; Kuramitsu et al., 2010; Kido et al., 2010; Scrideli et al., 2008; Qi et al., 2005; Rehman et al., 2012). С точки зрения механизма EEF1A1 ингибирует апоптоз, взаимодействуя с p53 и p73, способствует пролиферации за счет транскрипционной репрессии ингибитора клеточного цикла p21 и участвует в регуляции эпителиально-мезенхимального перехода (Blanch et al., 2013; Choi et al., 2009; Hussey et al., 2011).

Ген EEF1A1P5 кодирует псевдоген 5 эукариотического фактора 1 элонгации трансляции альфа 1 и локализуется на хромосоме 9q34.13 (RefSeq, 2002).

Ген FAM3 является членом семейства со схожестью последовательностей 3 (FAM3) и кодирует секретизируемый белок с доменом GG. Изменения в экспрессии этого белка были замечены в клетках, образованных из раковых клеток поджелудочной железы (RefSeq, 2002). При меланоме FAM3 был идентифицирован как кандидат на роль биомаркера аутофагии, важного механизма выживаемости опухолевых клеток (Zou et al., 2002; Kraja et al., 2015). FAM3 играет незаменимую роль в эпителиально-мезенхимальном переходе, который коррелирует с агрессивностью, развитием метастазов и плохой выживаемостью, в особенности при гепатоклеточном раке, колоректальном раке, раке легких и молочной железы (Csiszar et al., 2014; Gao et al., 2014c; Song et al., 2014; Chaudhury et al., 2010; Lahsnig et al., 2009).

Ген FAP кодирует трансмембранную серинпротеазу, которая селективно экспрессируется в реактивных формах стромальных фибробластов эпителиального вида рака (фибробласты, ассоциированные с раковой опухолью или РАФ), грануляционной ткани заживающих ран и злокачественных клетках кости и саркомах мягкой ткани (RefSeq, 2002). FAP играет важную роль в росте раковой опухоли и развитии метастазов за счет его участия в процессах клеточной адгезии, миграции и ремоделировании внеклеточного матрикса (ECM) (Jacob et al., 2012). Избыточная экспрессия FAP коррелирует с неблагоприятным прогнозом, более поздними стадиями опухоли, образованием метастазов и инвазивным потенциалом при различных видах рака, помимо прочих, раке толстой кишки, плоскоклеточной карциноме пищевода, аденокарциноме поджелудочной железы, глиобластоме, остеосаркоме, раке яичника и раке молочной железы (Wikberg et al., 2013; Kashyap et al., 2009; Cohen et al., 2008; Mentlein et al., 2011; Yuan et al., 2013; Zhang et al., 2011; Ariga et al., 2001).

Ген FKBP10 кодирует FK506-связывающий белок 10, который принадлежит к семейству пептидил-пролил-цис/транс-изомеразы типа FKBP. Продукт гена FKBP10 локализуется в эндоплазматическом ретикулуме и выступает в роли молекулярного шаперона (RefSeq, 2002). FKBP10 был идентифицирован в качестве нового гена, который участвует в приобретении и сохранении клетками лейкоза фенотипа, резистентного к действию адриамицина (Sun et al., 2014). 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).

Ген FLNA кодирует филамин А, актинсвязывающий белок, который образует поперечные связи между актиновыми филаментами и связывает волокна актина с гликопротеинами мембраны. Кодируемый белок задействован в ремоделировании цитоскелета, что вызывает изменения формы и миграции клетки, взаимодействует с интегринами, комплексами трансмембранных рецепторов и вторичными мессенджерами (RefSeq, 2002). В зависимости от своей субклеточной локализации филамин А играет двойную роль при раке: в цитоплазме филамин А выполняет функцию в различных сигнальных путях факторов роста в дополнение к участию в сигнальных процессах клеточной миграции и адгезии. Таким образом, его избыточная экспрессия способствует росту опухоли. В отличие от филамина А полной длины С-терминальный фрагмент, который высвобождается при протеолизе белков, локализуется в ядре, где он взаимодействует с факторами транскрипции и тем самым подавляет рост опухоли и метастазы (Savoy and Ghosh, 2013).

Ген GGA1 кодирует члена семейства ARF-связывающих белков, содержащего домен "уха" гамма-адаптинов (GGA), локализованного в аппарате Гольджи. Члены этого семейства являются повсеместными коатомерами, которые регулируют транспорт белков между сетью транс-Гольджи и лизосомой (RefSeq, 2002).

Ген HBB кодирует бета-цепь человеческого гемоглобина, железосодержащего металлопротеина транспорта кислорода в эритроцитах (RefSeq, 2002). Способность рака молочной железы образовывать метастазы в кости и висцеральные органы представляет собой четкий индикатор неблагоприятного клинического исхода по сравнению со случаями рака молочной железы с метастазами, ограниченными только костной тканью. Повышенная экспрессия HBB на участках костных метастазов коррелировала с их способностью быстро распространяться в другие органы (Capulli et al., 2012). HBB, как было продемонстрировано, избыточно экспрессируется в ткани карциномы шейки матки. Эктопическая экспрессия HBB в раковых клетках шейки матки подавляла окислительный стресс и повышала жизнеспособность клетки (Li et al., 2013).

Ген HBD кодирует дельта-цепь человеческого гемоглобина, железосодержащего металлопротеина

транспорта кислорода в эритроцитах. Две альфа-цепи и две дельта-цепи входят в состав гемоглобина A2, который вместе с гемоглобином F составляет 3% зрелого гемоглобина (RefSeq, 2002).

Ген HKDC1 кодирует белок 1, содержащий домен гексокиназы, проявляющий гексокиназную активность *in vitro* (Guo et al., 2015). При использовании нового способа идентификации потенциальных терапевтических мишеней по гетерогенным данным, HKDC1, среди других хорошо известных мишеней, был открыт в качестве новой потенциальной терапевтической мишени при раке легких (Li and Huang, 2014).

Ген HSPD1 кодирует митохондриальный белок 1 теплового шока 60 кДа, члена семейства шаперонинов, которые необходимы для сворачивания и сборки недавно импортированных белков в митохондриях и, возможно, действует как сигнальная молекула врожденной иммунной системы (RefSeq, 2002). Хотя HSPD1 рассматривается как внутримитохондриальный белок, он был обнаружен в цитозоли, клеточной мембране, везикулах, на клеточной поверхности, во внеклеточном пространстве и крови. Поскольку цитозольные уровни HSPD1 постепенно повышаются или падают во время канцерогенеза в различных органах, HSPD1 может быть использован в качестве диагностического и прогностического биомаркера пренеопластических и неопластических повреждений. Кроме того, некоторые недавно идентифицированные функции HSPD1 ассоциируются с канцерогенезом, конкретнее - с выживаемостью и пролиферацией опухолевой клетки, и интенсивно обсуждалось его использование в качестве многообещающей мишени для противоопухолевой терапии (Pace et al., 2013; Nakamura and Minegishi, 2013; Cappello et al., 2013; Cappello et al., 2011; Cappello et al., 2008).

Ген HYOU1 кодирует белок 1, уровень которого повышается в условиях гипоксии, известный лучше как белок, регулируемый глюкозой, 170 кДа (GRP170), который принадлежит к семейству белков 70 теплового шока. Экспрессия HYOU1 индуцируется стрессзависимым образом в условиях гипоксии и приводит к накоплению белков в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР). Белок, кодируемый HYOU1, как считается, играет важную роль в сворачивании и секреции белков в ЭР (RefSeq, 2002). Активность внутриклеточного белка HYOU1, как было показано, обеспечивает раковые клетки преимуществами для выживаемости во время прогрессирования или метастазирования опухоли. Внеклеточный белок HYOU1 играет незаменимую роль в генерировании противоопухолевых иммунных ответов, способствуя доставке опухолевых антигенов для их перекрестной презентации (Fu and Lee, 2006; Wang et al., 2014a). Белок HYOU1 применен в иммунотерапии рака и продемонстрировал положительное иммуномодулирующее действие (Yu et al., 2013; Chen et al., 2013a; Yuan et al., 2012; Wang and Subjeck, 2013). В клетках рака предстательной железы подавление HYOU1 продемонстрировало противоопухолевый эффект (Miyagi et al., 2001).

Ген IFT88 кодирует члена семейства тетратрикопептидных повторов (TPR) (RefSeq, 2002). Во время митоза IFT88 является частью комплекса, управляемого динеином-1, который перемещает кластеры периферических микротрубочек к полюсам веретена деления, чтобы гарантировать правильную ориентацию веретена. В культуре человеческих клеток истощение IFT88 вызывает митотические нарушения (Delaval et al., 2011). Потеря экспрессии гена IFT88 (также называемого Tg737) приводит к пролиферации стволовых клеток печени (овальные клетки), и поэтому он является геном-супрессором опухолей печени (Isfort et al., 1997). В 2012 г. было установлено, что мутация отвечает за возникновение новой формы цитопатии и аносмии у человека, которые излечивались у мышей генной терапией, опосредованной аденовирусом (McIntyre et al., 2012).

Ген IGF2BP3 кодирует инсулиноподобный фактор роста II мРНК-связывающий белок 3, онкофетальный белок, который подавляет трансляцию инсулиноподобного фактора роста II (RefSeq, 2002). Несколько исследований показали, что IGF2BP3 участвует в различных важных аспектах клеточных функций, таких как клеточная поляризация, миграция, морфология, метаболизм, пролиферация и дифференциация. 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, внутривеночной 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., 2013b; Hoffmann et al., 2008; Lin et al., 2013b; Yuan et al., 2009).

Ген ITGB4 кодирует белок семейства интегринов. Интегрины являются гетеродимерами, состоящими из нековалентно связанных альфа- и бета-субъединиц, которые являются трансмембранными гликопротеиновыми рецепторами. Они опосредуют адгезию между клетками и матриксом или межклеточную адгезию и передают сигналы, которые регулируют экспрессию генов и клеточный рост (RefSeq, 2002). 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 аг-

рессивности опухоли и выживаемость и может иметь прогностическую ценность для пациентов с раком молочной железы (Brendle et al., 2008).

Ген KCNK6 кодирует одного из членов надсемейства белков калиевых каналов, содержащих P-домены, образующих двойные поры. Это широко экспрессируемый каналный белок, рассматриваемый как белок открытого выпрямления. Он стимулируется арахидоновой кислотой и ингибируется внутренним подкислением и парообразными анестетиками (RefSeq, 2002). KCNK6 (называемый также K2P6.1) вместе с K2P1.1, K2P3.1, K2P5.1, K2P6.1, K2P7.1 и K2P10.1 демонстрировал значительно пониженную экспрессию среди видов рака, исследованных с использованием банка микрочиповых данных по онкологии в сети Интернет "Oncomine" (www.oncomine.org) (Williams et al., 2013).

Ген KCNN3 принадлежит к семейству KCNN калиевых каналов. Он кодирует интегральный мембранный белок, который образует потенциалнезависимый канал, активируемый кальцием, который, как считается, регулирует нейрональную возбудимость, принимая участие в медленном компоненте следовой [...] гиперполяризации (RefSeq, 2002). Экспрессия KCNN3 (называемого также TASK-1) снижалась под действием 17бета-эстрадиола в клетках N2A нейробластомы мышей и улучшала клеточную пролиферацию (Hao et al., 2014). Уровень экспрессии KCNN3 был повышен при воздействии на органоטיפическую культуру клеток рака молочной железы 1,25-дигидроксивитамином D (3) в физиологических концентрациях и концентрациях, превышающих физиологические (Milani et al., 2013). KCNN3 (называемый также K2P3.1) вместе с K2P1.1 и K2P12.1 избыточно экспрессировался в ряде видов рака, исследованных с использованием банка микрочиповых данных по онкологии рака в сети Интернет "Oncomine" (www.oncomine.org) (Williams et al., 2013).

Ген KDM1A (называемый также LSD1) кодирует ядерный белок, содержащий домен SWIRM, FAD-связывающий мотив, и домен аминоксидазы. Этот белок является компонентом нескольких комплексов гистондеацетилазы, хотя он подавляет гены, действуя как гистондеметилаза (RefSeq, 2002). Избыточная экспрессия KDM1A способствует пролиферации, миграции и инвазии опухолевых клеток и была ассоциирована с неблагоприятным прогнозом для НМРЛ и ГМК (Lv et al., 2012; Zhao et al., 2013). Повышенный уровень экспрессии KDM1A коррелирует с развитием рецидивов рака предстательной железы и повышенной экспрессией VEGF-A (Kashyap et al., 2013). Ингибирование KDM1A трихостатином А (TSA) в комбинации с 5-аза-2'-дезоксцитидином (децитабином) подавляет онкогенность асцитной линии клеток рака яичника SKOV3 (Meng et al., 2013).

Ген KIF26B кодирует члена надсемейства белков кинезинов (KIF), который необходим для развития почек. Экспрессия KIF26B ограничена метанефрической мезенхимой, и его транскрипция регулируется регулятором транскрипции Sall1 с доменом "zinc finger" (Terabayashi et al., 2012). Высокая экспрессия KIF26B при раке молочной железы ассоциируется с неблагоприятным прогнозом (Wang et al., 2013b). Повышенный уровень KIF26B имел значимую корреляцию с размером опухоли при анализе опухолевых тканей КРК и соответствующих образцов прилегающей нормальной слизистой оболочки. KIF26B играет важную роль в онкогенезе колоректальных опухолей и действует как новый прогностический фактор и потенциальная терапевтическая мишень при КРК (Wang et al., 2015).

Ген KRT19 кодирует члена семейства кератинов. Кератины - это белки промежуточных филаментов, отвечающие за структурную целостность эпителиальных клеток, и они подразделяются на цитокератины и кератин волос. KRT19 специфически экспрессируется в перидерме, временном поверхностном слое, который покрывает развивающуюся эпидерму (RefSeq, 2002). Экспрессия KRT19 в опухолевых клетках является прогностическим маркером нескольких видов опухолей, таких как рак молочной железы, легких, яичника и гепатоклеточный рак (Skondra et al., 2014; Gao et al., 2014b; Liu et al., 2013b; Lee et al., 2013a). Как было показано, KRT19 является независимым прогностическим фактором нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы, в особенности инсулиннегативных опухолей. KRT19-положительные опухоли ассоциируются с неблагоприятным исходом вне зависимости от установленных патологических параметров, таких как размер, митозы, инвазия в лимфатические узлы и некроз (Jain et al., 2010).

Ген KRT7 кодирует члена генного семейства кератинов. Цитокератины II типа состоят из основных или нейтральных белков, которые организуются в пары гетеротипических цепей кератина, совместно экспрессируемых во время дифференциации простых и многослойных тканей эпителия. Этот цитокератин II типа специфически экспрессируется в простом эпителии, выстилающем полости внутренних органов, и в протоках желез и кровеносных сосудах (RefSeq, 2002). KRT7 используется в иммуногистохимии для различения нескольких фенотипов и в качестве биомаркера - для прогнозирования определенных видов рака, например почечноклеточной карциномы, карциномы яичника, эпителиальных опухолей кожи и т.д. (Kuroda et al., 2013; McCluggage and Young, 2005; Alhumaidi, 2012).

Ген LAMC2 принадлежит к семейству ламининов, семейству гликопротеинов внеклеточного матрикса. Ламинины являются главными неколлагеновыми компонентами базальных мембран. Они задействованы во множестве биологических процессов, включая клеточную адгезию, дифференциацию, миграцию, передачу сигналов, отрастание нейритов и метастазирование. LAMC2 кодирует белок, который экспрессируется в нескольких фетальных тканях и специфически локализован в эпителиальных клетках кожи, легких и почек (RefSeq, 2002). LAMC2 экспрессируется в высокой степени в клетках анапластиче-

ской карциномы щитовидной железы и за счет модулирования сигнальных путей EGFR он ассоциируется с прогрессированием, миграцией и инвазией опухоли (Garg et al., 2014). Экспрессия LAMC2 обозначала худший прогноз для пациентов с колоректальным раком II стадии (Kevans et al., 2011). Как было обнаружено, экспрессия LAMC2 вместе с тремя другими биомаркерами значимо ассоциируется с присутствием метастазов в лимфатические узлы у пациентов с плоскоклеточной карциномой полости рта (Zanaruddin et al., 2013).

Ген LUM кодирует члена семейства малых протеогликанов, богатых лейцином (SLRP), которое включает декорин, бигликан, фибромодулин, кератокан, эпификан и остеоглицин. Люмикан - это основной кератансульфат-протеогликан роговой оболочки глаза и он также распространен в интерстициальных коллагеновых матрицах по всему организму. Люмикан может регулировать организацию и периферический рост коллагеновых фибрилл, прозрачность роговой оболочки глаза, миграцию эпителиальных клеток и репарацию тканей (RefSeq, 2002). Уровень белка LUM повышен в большинстве опухолевых тканей, таких как ткани рака молочной железы, колоректального рака и рака поджелудочной железы, по сравнению с нормальной тканью и ассоциируется с более высокой степенью злокачественности опухоли и неблагоприятным исходом. Тем не менее, внеклеточный люмикан ингибирует рост раковых клеток поджелудочной железы и ассоциируется с более долгой выживаемостью после хирургической операции (Leygue et al., 1998; Seya et al., 2006; Ishiwata et al., 2007; Li et al., 2014). LUM и другие гены, связанные с целостностью внеклеточного матрикса, (DCN и DPT) экспрессируются дифференциально и могут служить в качестве биомаркеров метастатической и рецидивирующей опухоли гигантских клеток кости (Lieveld et al., 2014). Экспрессия LUM понижена при цисплатин-, доксорубин-, топотекан- и паклитакселрезистентных вариантах клеточной линии A2780 рака яичника (Januchowski et al., 2014).

Ген MAP4 кодирует основной белок, ассоциированный с микротрубочками ненейронального происхождения, который способствует сборке микротрубочек и препятствует их дестабилизации, "катастрофическому" разрушению в интерфазе. Фосфорилирование этого белка влияет на свойства микротрубочек и ход клеточного цикла (RefSeq, 2002). Высокие уровни MAP4, как было показано, положительно коррелируют со степенью злокачественности рака мочевого пузыря, тогда как фосфорилирование белка протеинкиназой A снижает уровень миграции и инвазии раковых клеток мочевого пузыря (Ou et al., 2014). В исследовании с пациентами, страдающими немелкоклеточным раком легких, сообщалось о повышенном соотношении MAP4 и мРНК статмина в опухолевых образцах по сравнению с нормальными образцами, указывая на то, что это соотношение могло бы служить в качестве биомаркера немелкоклеточного рака легких (Cucchiarelli et al., 2008). Уровни MAP4, которые негативно регулируются супрессором опухоли p53, влияют на эффективность препаратов, мишенями которых являются микротрубочки. Высокие уровни повышают воздействие лекарственных препаратов (таксанов), стабилизирующих микротрубочки, и снижают воздействие препаратов, дестабилизирующих микротрубочки (алкалоиды барвинка), тогда как низкие уровни MAP4 оказывают противоположный эффект (Hait and Yang, 2006; Galmarini et al., 2003; Zhang et al., 1999).

Ген MMP7 кодирует фермент, который расщепляет протеогликаны, фибронектин, эластин и казеин и отличается от большинства членов семейства MMP отсутствием консервативного С-терминального белкового домена. Белки семейства матричной металлопротеиназы (MMP) задействованы в разрушении внеклеточного матрикса при нормальных физиологических процессах, таких как эмбриональное развитие, репродукция и ремоделирование тканей, в равной степени, как и во время заболеваний, таких как артрит и образование метастазов (RefSeq, 2002). MMP7 часто экспрессируется в избытке в раковых тканях человека, включая колоректальный рак, метастатическую карциному легких и рак желудка, и ассоциируется с прогрессированием рака и образованием метастазов (Ii et al., 2006; Sun et al., 2015a; Han et al., 2015; Long et al., 2014). MMP7, как было продемонстрировано, играет важные роли в содействии развитию опухоли, такие как деградация белков внеклеточного матрикса, активация пролиферации опухолевых клеток за счет повышения биодоступности инсулиноподобного фактора роста и эпидермального фактора роста, связывающего гепарин, а также индукция апоптоза в окружающих опухоль клетках, отщепляя Fas-лиганд, связанный с мембраной (Ii et al., 2006).

Ген MROH6, также известный как C8orf73, локализован на хромосоме 8q24.3 (RefSeq, 2002).

Ген MX1 кодирует белок, метаболизирующий гуанозинтрифосфат (GTP), индуцируемый интерферонами I и II типа, и участвует в клеточном ответе на вирусную инфекцию (RefSeq, 2002). Роль MX1 при раке еще не полностью ясна. С одной стороны, экспрессия MX1 обратно коррелирует с раком предстательной железы, снижает образование метастазов и усиливает чувствительность к доклетакселу. Кроме того, эпигенетическое выключение MX1 гиперметилованием было обнаружено в плоскоклеточной карциноме головы и шеи, и экспрессия MX1 снижает подвижность клеток и инвазивность клеточных линий рака предстательной железы и меланомы, - все это свидетельствует о роли MX1 как опухолевого супрессора (Brown et al., 2015; Calmon et al., 2009; Mushinski et al., 2009). С другой стороны, однонуклеотидный полиморфизм в гене MX1 ассоциируется с раком предстательной железы, и высокий уровень экспрессии MX1 ассоциируется с метастазами в лимфатические узлы при колоректальном раке, что указывает на онкогенные свойства MX1 (Croner et al., 2014; Glymph et al., 2013).

Ген MXRA5 кодирует один из белков, ассоциированных с ремоделированием матрикса, который

содержит 7 обогащенных лейцином повторов и 12 иммуноглобулинподобных доменов типа C2, связанных с перлеканом (RefSeq, 2002). Проведенное в Китае клиническое исследование идентифицировало MXRA5 в качестве второго наиболее часто подвергающегося мутации гена при немелкоклеточном раке легких (Xiong et al., 2012). Как было показано, MXRA5 избыточно экспрессируется при раке толстой кишки и мог бы служить в качестве биомаркера для постановки диагноза на ранних стадиях и метастазов в сальнике (Zou et al., 2002; Wang et al., 2013a).

Ген MYH9 кодирует тяжелую цепь обычного немышечного миозина IIА, которая содержит домен IQ и домен, подобный головке миозина, который задействован в нескольких важных функциях, в том числе цитокинезе, подвижности клеток и сохранении формы клетки (RefSeq, 2002). Высокие уровни экспрессии MYH9, как было показано, ассоциировались с неблагоприятным прогнозом при плоскоклеточной карциноме пищевода и в комбинации с аннексином II и белком "kindling-2" могут служить в качестве предсказательного биомаркера общей выживаемости и выживаемости без признаков заболевания при этом заболевании (Xia et al., 2012; Cao et al., 2014). Мутации гена MYH9 были идентифицированы в образцах рака молочной железы человека, и он дифференцированно экспрессируется при карциноме толстой кишки (Ellis et al., 2012; Mu et al., 2013). Исследования *in vitro* и с ксенотрансплантами указывают на то, что MYH9 способствует росту и инвазии опухолевых клеток различных клеточных линий рака, в том числе клеток рака молочной железы и немелкоклеточного рака легких (Robinson et al., 2013; Lin et al., 2013a; Lund et al., 2012; Derycke et al., 2011; Medjkane et al., 2009).

Ген MYL12A кодирует регуляторную легкую цепь несаркомерного миозина, который регулирует сокращение гладких мышц и немышечных клеток (Amatschek et al., 2004; RefSeq, 2002). О фосфорилировании MYL12A сообщалось, что оно способствует подвижности и инвазии опухолевых клеток *in vitro* и в моделях с животными (Manning, Jr. et al., 2000; Kaneko et al., 2002; Khuon et al., 2010). Кроме того, за счет секвестрирования фактора транскрипции, антагониста апоптоза, транскрипционного регулятора MYL12A, по-видимому, регулирует репарацию повреждений ДНК и p53-зависимый апоптоз (Hopker et al., 2012a; Hopker et al., 2012b).

Ген MYL12B кодирует регуляторную легкую цепь немышечного миозина II (MYH9). Фосфорилирование MYL12B приводит к более высокой активности Mg-АТФазы и сборки филаментов миозина II (RefSeq, 2002). Как было показано, уровень этого белка повышен при раке яичника 3 степени злокачественности и блокировка фосфорилирования или активации MYL12B фармакологическими средствами понижала способность раковых клеток к миграции и инвазии *in vitro*, а также образование метастазов в модели рака молочной железы у животных. Эти данные указывают на прометастатическую роль MYL12B (Lim et al., 2011; Menhofer et al., 2014; Zhang et al., 2013; Patel et al., 2012).

Ген PARD3B кодирует белок, локализованный в зоне плотных контактов эпителиальных клеток, и участвует в установлении клеточной полярности (Izaki et al., 2005). Однонуклеотидный полиморфизм в гене PARD3B, как было показано, значимо ассоциируется с тяжелым токсическим действием лекарственных препаратов на печень у детей с острым лимфобластным лейкозом или лимфобластной лимфомой (Hoginouchi et al., 2010).

Ген PDIA6 (называемый также ERp5) кодирует белок дисульфидизомеразу, резидентный белок эндоплазматического ретикулума (ЭР), катализирующий образование, распад и изомеризацию дисульфидных связей в белках и, как считается, играющий роль в сворачивании белков с дисульфидными связями (RefSeq, 2002). Иммуноокрашивание микрочипов с тканью предстательной железы для выявления PDIA6 показали существенно более высокую иммунореактивность предраковых очагов в сравнении с незлокачественным эпителием ($P < 0,0001$, U-критерий Манна-Уитни) и образцов с высокой степенью злокачественности по Глисон (4-5) в сравнении с раком низким показателем (2-3) злокачественности ($P < 0,05$) (Glen et al., 2010). Высокий уровень экспрессии ERp5/ADAM10 ведет к слушиванию MICA и нарушению распознавания лигандов NKG2D в микроокружении лимфатических узлов при лимфоме Ходжкина. Это ведет к снижению уровня поверхностной экспрессии NKG2D на CD8 Т-клетках и неэффективному противоопухолевому ответу (Zocchi et al., 2012). Белки дисульфидизомеразы PDIA4 и PDIA6 опосредуют резистентность к индуцируемой цисплатином клеточной гибели при аденокарциноме легких (Hogibe et al., 2014).

Ген PIK3IP1 кодирует белок 1, взаимодействующий с фосфоинозитид-3-киназой, ингибитором PI3K (RefSeq, 2002). Снижение уровня PIK3IP1 приводит к увеличению роста клеток опухоли Т-клеточной лимфобластоидной лимфомы человека (Wong et al., 2014). Уровень PIK3IP1 понижен при гепатоклеточной карциноме (ГКК), и PIK3IP1 подавляет развитие ГКК (He et al., 2008).

Ген PLEC кодирует плектин, члена семейства плакинов, белок, задействованный в поперечной сшивке и организации цитоскелета и комплексов адгезии (Bouameur et al., 2014). PLEC экспрессируется в избытке клетками колоректальной аденокарциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи и рака поджелудочной железы (Lee et al., 2004; Katada et al., 2012; Bausch et al., 2011).

Ген POTE кодирует белок семейства POTE, имеющий анкириновый домен, члена E, один из 13 паралофов, принадлежащих к семейству генов POTE. Как считается, гены POTE представляют новое семейство раковотестискулярных антигенов. Биологическая функция семейства генов POTE все еще недостаточно хорошо изучена, но некоторые свидетельства предполагают их проапоптотическую роль (Liu et

al., 2009; Vera et al., 2006). POTEЕ преимущественно экспрессируется в раковых опухолях предстательной железы, молочной железы, толстой кишки, легких и яичника (Vera et al., 2006). В одном исследовании при использовании комбинации транскриптомного и протеомного подходов была описана тесная взаимосвязь POTEЕ с раком молочной железы (Cine et al., 2014).

Ген POTEF кодирует белок семейства POTE, имеющий анкириновый домен, члена J, один из 13 паралогов, принадлежащих к семейству генов POTE. Как считается, гены POTE представляют новое семейство раковотестикулярных антигенов. Биологическая функция семейства генов POTE все еще не достаточно хорошо изучена, но некоторые свидетельства предполагают их проапоптотическую роль (Liu et al., 2009; Vera et al., 2006). Как было показано, POTEF индуцирует апоптоз в клетках линии Hela, используя для этого митохондриальный механизм (Liu et al., 2009). POTEЕ преимущественно экспрессируется в раковых опухолях предстательной железы, молочной железы, толстой кишки, легких и яичника (Vera et al., 2006).

Ген POTEI, локализованный на хромосоме 2q21.1, кодирует белок семейства POTE, имеющий анкириновый домен, члена I, один из 13 паралогов, принадлежащих к семейству генов POTE. Как считается, гены POTE представляют новое семейство раковотестикулярных антигенов. Биологическая функция семейства генов POTE все еще не достаточно хорошо изучена, но некоторые свидетельства предполагают их проапоптотическую роль (Liu et al., 2009; Vera et al., 2006). POTEI преимущественно экспрессируется в раковых опухолях предстательной железы, молочной железы, толстой кишки, легких и яичника (Vera et al., 2006).

Ген POTEJ кодирует белок семейства POTE, имеющий анкириновый домен, члена J, один из 13 паралогов, принадлежащих к семейству генов POTE. Как считается, гены POTE представляют новое семейство раковотестикулярных антигенов. Биологическая функция семейства генов POTE все еще не достаточно хорошо изучена, но некоторые свидетельства предполагают их проапоптотическую роль (Liu et al., 2009; Vera et al., 2006). POTEJ преимущественно экспрессируется в раковых опухолях предстательной железы, молочной железы, толстой кишки, легких и яичника (Vera et al., 2006).

Ген POTEKP кодирует белок семейства POTE, имеющий анкириновый домен, члена K, псевдоген, и он локализован на хромосоме 2q21.1 (RefSeq, 2002).

Ген POTE M кодирует белок семейства POTE, имеющий анкириновый домен, члена M, один из 13 паралогов, принадлежащих к семейству генов POTE. Как считается, гены POTE представляют новое семейство раковотестикулярных антигенов. Биологическая функция семейства генов POTE все еще не достаточно хорошо изучена, но некоторые свидетельства предполагают их проапоптотическую роль (Liu et al., 2009; Vera et al., 2006). POTE M был идентифицирован как специфический транскрипт для нормальной и злокачественной ткани предстательной железы (Stolk et al., 2004).

Ген PTRF кодирует полимеразу I и фактор, необходимый для правильного освобождения транскриптов, регулятор транскрипции рРНК, который способствует диссоциации транскрипционных комплексов и повторной инициации полимеразы I на формирующихся рРНК-транскриптах (RefSeq, 2002). Уровень PTRF понижен в клеточных линиях рака молочной железы и опухолевой ткани молочной железы (Bai et al., 2012). PTRF - это биомаркер немелкоклеточного рака легких (Gamez-Pozo et al., 2012). Уровень экспрессии PTRF понижен при раке предстательной железы, и отсутствие PTRF в клетках рака предстательной железы вносит свой существенный вклад в прогрессирование опухоли и метастазирование, стимулируя ангиогенный потенциал раковых клеток (Nassar et al., 2013).

Ген PUS7L кодирует белок, подобный гомологу псевдоуридилатсинтазы 7 (*s. cerevisiae*), возможно, имеющий активность псевдоуридилатсинтазы. Ген PUS7L локализован на хромосоме 12q12 (RefSeq, 2002).

Ген RAN кодирует RAN, члена семейства онкогенов RAS, малый ГТФ-связывающий белок, который задействован в транслокации РНК и белков через ядерный поровый комплекс, в контроле синтеза ДНК и хода клеточного цикла, в формировании и организации сети микротрубочек и в активации андрогенного рецептора (RefSeq, 2002). RAN является ключевым белком метастатического прогрессирования рака. RAN избыточно экспрессируется в ряде опухолей, например молочной железы и почек (Matchett et al., 2014).

Ген RANP1 кодирует RAN, члена семейства онкогенов RAS, псевдоген 1, псевдоген, который локализован на хромосоме 6p21.33 (RefSeq, 2002).

Ген RASA4 кодирует белок-активатор 4 RAS p21, Ca (2+)-зависимый ГТФаза-активирующий белок Ras, который подавляет активность сигнального пути Ras-MAPK в ответ на Ca(2+) (RefSeq, 2002). RASA4 значимо амплифицирован в первичной эффузионной лимфоме (Roy et al., 2011). Дифференциальная экспрессия RASA4 наблюдается в клетках аденокарциномы эндометрия по сравнению с нормальным эндометрием (Jeda et al., 2014).

Ген RASA4B кодирует активатор 4B RAS-белка (p21), Ca (2+)-зависимый ГТФаза-активирующий белок, возможно, задействованный в регуляции сигнального пути Ras-MAPK (RefSeq, 2002).

Ген RCN1 кодирует ретикулокальбин 1, кальцийсвязывающий EF-hand домен, кальцийсвязывающий белок, локализованный в полости эндоплазматического ретикулума. 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).

Ген RGS4 кодирует регулятор сигнального пути G-белка 4, ГТФаза-активирующий белок (GAP) для субъединиц G-альфа гетеротримерных G-белков (RefSeq, 2002). Было выявлено, что уровень RGS4 статистически значимо понижен в метастазах печени и на границе опухолевой инвазии по сравнению с первичной опухолью поджелудочной железы (Niedergethmann et al., 2007). RGS4 очень часто избыточно экспрессируется в клетках карциномы щитовидной железы, хотя он не экспрессируется в нормальных тканях человека (Nikolova et al., 2008). Транскрипт RGS4 был обнаружен в нераковых иммортализованных клетках поверхностного эпителия яичника на уровне, в несколько тысяч раз превосходящем его уровень экспрессии в клеточных линиях рака яичника (Hurst et al., 2009).

Ген RPS6 кодирует рибосомный белок S6, цитоплазматический рибосомный белок, который является компонентом 40S-субъединицы рибосомы. RPS6 может вносить свой вклад в контроль роста и пролиферации клетки за счет селективной трансляции определенных классов мРНК (RefSeq, 2002). RPS6 - это нисходящая мишень белка mTOR и, как было обнаружено, ассоциируется с многочисленными физиологическими и патофизиологическими функциями (Chen et al., 2014a). Фосфорилирование RPS6 ослабляет повреждение ДНК и супрессию опухоли во время развития рака поджелудочной железы (Khalilah et al., 2013).

Ген RPS8 кодирует рибосомный белок S8, цитоплазматический рибосомный белок, который является компонентом 40S-субъединицы рибосомы. Экспрессия RPS8 повышена при колоректальных опухолях и полипах толстой кишки по сравнению с соответствующей нормальной кишечной слизистой оболочкой (RefSeq, 2002). Повышенный уровень RPS8 у пациентов с протоковой аденокарциномой поджелудочной железы коррелирует с короткой выживаемостью (Chen et al., 2015).

Ген RPS8P10 кодирует псевдоген 10 рибосомного белка S8, псевдоген, локализованный на хромосоме 15q11.2 (RefSeq, 2002).

Ген SCG5 кодирует секретогранин V (белок 7B2), нейроэндокринный секреторный белок (Portela-Gomes et al., 2008). Дупликация, охватывающая 3'-конец гена SCG5 и участок по ходу транскрипции локуса GREM1, может повышать риск развития колоректального рака (Jaeger et al., 2012; Yang et al., 2014b).

Ген SERPINB2 кодирует ингибитор серпин-пептидазы, клада В (овальбумин), член 2, ингибитор внеклеточного плазминогенного активатора протеазной урокиназы и тканевого плазминогенного активатора (Schroder et al., 2014). SERPINB2 экспрессируется в ряду различных опухолей. Экспрессия SERPINB2 ассоциируется с благоприятным прогнозом при раке молочной железы и поджелудочной железы, но неблагоприятным прогнозом - при раке эндометрия, яичника и колоректальном раке (Schroder et al., 2014).

Ген SERPINB3 кодирует ингибитор серпин-пептидазы семейства ингибиторов протеазы, клада В (овальбумин), член 3 (RefSeq, 2002). SERPINB3 - это Ras-чувствительный фактор, играющий важную роль в Ras-ассоциированной выработке цитокинов и онкогенезе (Catanzaro et al., 2014). Уровень экспрессии SERPINB3 повышен в клетках гепатоклеточной карциномы (Pontisso, 2014). SERPINB3 ассоциируется с развитием рака яичника (Lim and Song, 2013).

Ген SERPINB4 кодирует ингибитор серпин-пептидазы семейства ингибиторов протеазы, клада В (овальбумин), член 4 (RefSeq, 2002). SERPINB4 - это Ras-чувствительный фактор, играющий важную роль в Ras-ассоциированной выработке цитокинов и онкогенезе (Catanzaro et al., 2014). Уровень экспрессии SERPINB4 повышен в клетках гепатоклеточной карциномы (Pontisso, 2014).

Ген SERPINH1 кодирует ингибитор серпин-пептидазы, клада H (белок теплового шока 47), член 1, (коллаген-связывающий белок 1), ингибитор серин-протеиназы. SERPINH1 выполняет функцию коллаген-специфического молекулярного шаперона в эндоплазматическом ретикулуме (RefSeq, 2002). SERPINH1 экспрессируется в избытке во многих видах раковых опухолей человека, включая рак желудка, рак легких, протоковую аденокарциному поджелудочной железы, глиому и карциномы, ассоциированные с язвенным колитом (Zhao et al., 2014).

Ген SEZ6L кодирует гомолог белка 6, подобный мышиному, связанному с эпилептическими приступами, трансмембранный белок с несколькими доменами, задействованный в межбелковых взаимодействиях и передаче сигналов (Nishioka et al., 2000). SEZ6L гиперметилирован при раке желудка (Kang et al., 2008). Уровень экспрессии SEZ6L повышен при немелкоклеточном раке легких и мелкоклеточном раке легких, а также в образцах первичных опухолей по сравнению с нормальными тканями легких (Gorlov et al., 2007).

Ген SLC16A3 кодирует члена 3 семейства транспортеров растворенных веществ 16, монокарбоксилатный транспортер в симпорте с протоном (RefSeq, 2002). В большинстве солидных опухолей, как известно, выработка энергии зависит от гликолиза. Высокий уровень гликолиза приводит к повышению выработки лактата, что ассоциировалось с неблагоприятным клиническим исходом и прямым способствованием росту и прогрессированию опухоли. SLC16A3 - это один из немногочисленных транспортеров монокарбоксилатов, который способствует экспорту лактатов из раковых клеток (Dhur et al., 2012; Draoui and Feron, 2011). Экспрессия SLC16A3 ассоциировалась с неблагоприятным прогнозом у пациентов с гепатоклеточным раком и повышением клеточной пролиферации, миграции и инвазии в экспери-

ментах с клеточными линиями (Gao et al., 2014a). Функциональное участие SLC16A3 в онкогенезе было продемонстрировано в подгруппе рака поджелудочной железы (Baek et al., 2014).

Ген MTCL1 кодирует фактор 1, сшивающий микротрубочки. MTCL1, как было показано, задействован в зависимом от полярности ремоделировании микротрубочек и опосредует реорганизацию нецентросомных микротрубочек, специфическую для эпителиальных клеток путем образования поперечных связей между микротрубочками (Sato et al., 2013).

Ген SST кодирует препро-белок гормона соматостатина. Соматостатин экспрессируется по всему организму и ингибирует высвобождение многочисленных других гормонов. Этот гормон является важным регулятором эндокринной системы за счет его взаимодействия с гипофизарным гормоном роста, стимулирующим гормоном щитовидной железы и большинством гормонов желудочно-кишечного тракта. Соматостатин также влияет на уровень нейротрансмиссии в центральной нервной системе и пролиферации как нормальных, так и онкогенных клеток (RefSeq, 2002). Аналоги SST успешно используются и проходят дальнейшие исследования в качестве терапевтического подхода в лечении нейроэндокринных (карциноидных) опухолей желудочно-кишечного тракта или поджелудочной железы, гепатоклеточного рака и рака молочной железы (Pivonello et al., 2014; Culler, 2011; Appetecchia and Baldelli, 2010; Modlin et al., 2010; Watt et al., 2008).

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

Ген TSC22D4 кодирует белок, являющийся членом семейства домена TSC2 транскрипционных регуляторов, содержащих домен лейциновых застежек (RefSeq, 2002). Уровни TSC22D4 в печени были повышены при раковой кахексии (Jones et al., 2013).

Ген TUBA1A кодирует тубулин, альфа 1a. Экспрессия TUBA1A преимущественно обнаружена в морфологически дифференцированных клетках нервной системы. Мутации этого гена вызывали лиссэнцефалию 3 типа (LIS3) - неврологическое состояние, характеризующееся микроцефалией, умственной отсталостью и эпилепсией с ранним началом, лиссэнцефалия вызывается нарушением миграции нервных клеток (RefSeq, 2002). Нарушение регуляции экспрессии TUBA1A и некоторых других генов, вызванное хромосомными перестройками в трансформированных облучением и онкогенных клеточных линиях молочной железы, возможно, отражает ранние стадии молекулярных процессов при развитии опухоли молочной железы (Linger et al., 2010). При использовании сравнительного протеомного анализа распространенной карциномы серозного эпителия яичника TUBA1A был идентифицирован как один из потенциальных прогностических факторов химиорезистентности (Kim et al., 2011).

Ген TUBA1B кодирует тубулин, альфа 1b (RefSeq, 2002). Дифференцированная экспрессия TUBA1B в комбинации с экспрессией некоторых других генов ассоциировалась с прогнозом при лимфоме из клеток мантийной зоны, предсказанием рецидива среди пациентов с колоректальным раком II стадии и различием увеальных меланом с последующим метастазированием и без него (Blenk et al., 2008; Ageesen et al., 2012; Linge et al., 2012). Экспрессия TUBA1B была повышена в тканях гепатоклеточного рака и пролиферирующих клетках гепатоклеточного рака. Повышенный уровень экспрессии TUBA1B ассоциировался с плохой общей выживаемостью и развитием резистентности к паклитакселу у пациентов с гепатоклеточным раком (Lu et al., 2013a). В клетках рака яичника низкий уровень экспрессии TUBA1B ассоциировался с резистентностью к оксалиплатину (Tummala et al., 2009).

Ген TUBA1C кодирует тубулин, альфа 1c (RefSeq, 2002). Как было продемонстрировано, уровень TUBA1C был повышен при остеосаркоме и гепатоклеточном раке, ассоциированном с вирусом гепатита С, и он может быть потенциальным биомаркером онкогенеза остеосаркомы или хорошо дифференцированного гепатоклеточного рака, ассоциированного с вирусом гепатита С (Kuramitsu et al., 2011; Li et al., 2010).

Ген TUBA3C кодирует тубулин, альфа 3c (RefSeq, 2002). Ген TUBA3D кодирует тубулин, альфа 3d (RefSeq, 2002). Ген TUBA4A кодирует тубулин, альфа 4a (RefSeq, 2002). Сравнительный протеомный анализ плоскоклеточной карциномы пищевода (ПлККП) продемонстрировал повышенный уровень экспрессии TUBA4A (Qi et al., 2005).

Ген TUBA8 кодирует тубулин, альфа 8. Мутации TUBA8 ассоциируются с полимикрогирией и гипоплазией зрительного нерва (RefSeq, 2002). В печени мыши TUBA8 индуцировался после лечения фенбарбиталом, негенотоксичным канцерогеном. Как было показано, в клеточных линиях гепатоклеточной карциномы избыточная экспрессия TUBA8 влияет на рост, пролиферацию и миграцию клеток (Kamino et al., 2011).

Ген UCN3 является членом семейства савагин/кортикотропин-высвобождающего фактора/уротензина I. По структуре он сходен с геном кортикотропин-высвобождающего фактора (CRF), и кодируемый продукт является эндогенным лигандом для рецепторов CRF 2 типа. В головном мозгу он может отвечать за влияние стресса на аппетит (RefSeq, 2002). Ucn3 вырабатывается в нормальной надпочечной железе и опухолях надпочечной железы (как в адренокортикальных опухолях, так и феохромоцитоме), и действует как аутокринный или паракринный регулятор в нормальной надпочечной железе и опухолях надпочечной железы (Takahashi et al., 2006). Урокортин 3 активирует сигнальные пути AMPK и АКТ и усиливает утилизацию глюкозы в скелетных мышцах крыс (Roustit et al., 2014).

Ген VCAN является членом семейства протеогликанов - агрекана и версикана. Кодированный белок является крупным хондроитинсульфат-протеогликаном и основным компонентом внеклеточного матрикса. Этот белок задействован в клеточной адгезии, пролиферации, миграции и ангиогенезе и играет центральную роль в морфогенезе и поддержании жизнедеятельности тканей (RefSeq, 2002). Экспрессия VCAN в ассоциированных с раком фибробластах регулировалась сигнальными путями рецептора TGF-бета II типа и SMAD-сигнальным каскадом. Повышенное количество VCAN способствовало подвижности и инвазивности клеток рака яичника за счет активации сигнального пути NF-каппаВ и повышения уровня экспрессии CD44, матриксной металлопротеиназы 9 и рецептора гиалуронан-опосредованной подвижности (Yeung et al., 2013). Генетическая подпись ремоделирования коллагена, включая сигнальный путь TGF-бета, регулируемый VCAN, ассоциируется с метастазированием и плохой выживаемостью при серозном раке яичника (Cheon et al., 2014). Уровень VCAN значительно повышен при КРК при сравнении соответствующих образцов здоровой слизистой оболочки толстой кишки с опухолевой тканью 53 пациентов (Pitule et al., 2013).

Ген 16 бескрылого типа семейства места интеграции MMTV, кодирует секретлируемый сигнальный белок, участвующий в онкогенезе и в нескольких процессах развития, в том числе регулировании клеточной судьбы и формировании паттерна генов во время эмбриогенеза (RefSeq, 2002). Как было показано, экспрессия WNT16 повышена при остром лимфобластном лейкозе (ОЛЛ) с хромосомной транслокацией t(1;19) и играет важную роль в лейкемогенезе (Casagrande et al., 2006; Mazieres et al., 2005). Исследование клеточных линий ОЛЛ и образцов пациентов с ОЛЛ продемонстрировало, что повышенный уровень WNT16 и немногих других генов-мишеней сигнального пути Wnt был вызван метилированием ингибиторов Wnt, который, кроме того, ассоциировался с значительно меньшей 10-летней выживаемостью без признаков заболевания и общей выживаемостью (Roman-Gomez et al., 2007).

Ген WNT5A принадлежит к семейству генов WNT, которое состоит из сходных по структуре генов, кодирующих секретлируемые сигнальные белки. Данные белки были задействованы в онкогенезе и в нескольких процессах развития, в том числе регулировании клеточной судьбы и формировании паттерна генов во время эмбриогенеза. Ген WNT5A кодирует члена семейства WNT, который является элементом как канонических, так и неканонических путей передачи сигнала WNT. Этот белок является лигандом для семипроходного трансмембранного рецептора семейства frizzled-5 и орфанного рецептора тирозинкиназы 2. Этот белок играет незаменимую роль в регулировании механизмов развития во время эмбриогенеза. Этот белок может также играть роль в онкогенезе (RefSeq, 2002). WNT5A избыточно экспрессируется в КРК и имеет уровень конкордантности 76% между первичной опухолью и местом метастазирования (Lee et al., 2014). Уровень WNT5A повышен, и он является ведущим регулятором эпителиально-мезенхимального перехода и метастазирования в клетках карциномы желудка, назофарингеальной карциномы и рака поджелудочной железы человека (Kanzawa et al., 2013; Zhu et al., 2014; Bo et al., 2013).

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 цитозоли. Молекулы МНС человека называются также человеческими лейкоцитарными антигенами (HLA).

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

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

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

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%

Частоты экспрессии выведены из частот гаплотипа Gf среди американцев, приводимых в работе Mori и соавт. (Mori et al., 1997), с использованием формулы Харди-Вайнберга $F=1-(1-Gf)^2$. 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 и соавт. (Chanock et al., 2004).

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

Если пептиды A*02 по изобретению скомбинировать с пептидами, связывающимися с другим аллелем, например A*24, лечение может пройти более высокий процент любой популяции пациентов по сравнению с вакцинацией для каждого аллеля MHC 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.allelefrequencies.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 регу-

ляторные элементы, образованные из микробного или вирусного оперона.

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

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

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

Кодирующая область может быть получена из немутировавшего ("нормального"), мутировавшего или измененного гена или может 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 определено рассматривается в изобретении. Более того, определено включен заявленный полипептид, чистота которого составляет предпочтительно 99,999 мас.%, или по меньшей мере 99,99 мас.%, или 99,9 мас.% и даже желательно 99 мас.% 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 мас.%, предпочтительно по меньшей мере около 0,1 мас.%. Рассматриваются также обогащенные препараты с концентрацией примерно 0,5, 1, 5, 10 и 20 мас.%. 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, последовательности 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, представляют собой различие; и
 - (iv) выравнивание должно начинаться с позиции 1 выровненных последовательностей;
- и "R" - это число оснований или аминокислот в контрольной последовательности по длине выравнивания со сравниваемой последовательностью с любой брешью, образующейся в контрольной последовательности, считающейся также за основание или аминокислоту.

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

Как было упомянуто ранее, 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: 67 или ее вариант, который на 88% гомологичен последовательностям с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 67 или их варианту, который будет индуцировать Т-клеточную перекрестную реакцию с указанным пептидом. Пептиды по изобретению обладают способностью связываться с молекулой главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) I класса или - удлинённые версии упомянутых пептидов - с МНС II класса.

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

Специалист данной области будет в состоянии оценить, будут ли Т-клетки, индуцированные вариантом конкретного пептида, способны к перекрестной реакции с самим пептидом (Arrau et al., 2006; Co-

Iombetti 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, при их замещении боковой цепью другого встречающегося в природе аминокислотного остатка или какой-либо другой боковой цепью), так что пептид по-прежнему способен связываться с молекулой HLA, по существу, таким же путем, как и пептид, состоящий из данной аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 67. Например, пептид может быть модифицирован таким образом, что он, по меньшей мере, сохранит, если не улучшит, способность взаимодействовать и связываться со связывающей бороздкой подходящей молекулы МНС, такой как HLA-A*02 или -DR, и, таким образом, он, по меньшей мере, сохранит, если не улучшит, способность связываться с ТКР активированных Т-клеток.

Данные Т-клетки могут затем вступать в перекрестную реакцию с клетками и уничтожать клетки, которые экспрессируют полипептид, который содержит природную аминокислотную последовательность родственного пептида, как определено в аспектах этого изобретения. По информации из научной литературы и банков данных (Rammensee et al., 1999; Godkin et al., 1997) конкретные позиции связывающихся с HLA пептидов являются типичными якорными остатками, формирующими центральную последовательность, подходящую к соединительному элементу рецептора HLA, который определяется полярными, электрофизическими, гидрофобными и пространственными свойствами полипептидных цепей, образующих связывающую бороздку. Так специалист данной области будет в состоянии модифицировать аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 67, сохраняя известные якорные остатки и будет в состоянии определить, сохраняют ли такие варианты способность связываться с молекулами МНС I или II класса. Варианты по настоящему изобретению сохраняют способность связываться с ТКР активированных 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 обмена внутри одной из последующих пяти групп: группа 1 - малые, алифатические, неполярные или слабо полярные остатки (Ala, Ser, Thr, Pro, Gly); группа 2 - полярные, отрицательно заряженные остатки и их амиды (Asp, Asn, Glu, Gln); группа 3 - полярные, положительно заряженные остатки (His, Arg, Lys); группа 4 - крупные, алифатические, неполярные остатки (Met, Leu, Ile, Val, Cys) и группа 5 - крупные, ароматические остатки (Phe, Tyr, Trp).

Менее консервативные замены могут охватывать замену одной аминокислоты другой, имеющей похожие характеристики, но отличающейся в какой-то степени по размеру, как в случае замены аланина остатком изолейцина. 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 охватываемые настоящим раскрытием сущности изобретения. Кроме того, нестандартные аминокислоты (т.е. отличающиеся от повсеместно встречающихся протеиногенных аминокислот) могут быть также использованы в целях замены для получения иммуногенов и иммуногенных полипептидов в соответствии с настоящим изобретением.

Если были произведены замены в более чем одной позиции с получением пептида, 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 настоящей заявке, может иметь замену одной или двух неякорных аминокислот (см. ниже относительно якорного мотива), так что способность связываться с молекулой главного комплекса гистосовместимости человека

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

Аминокислотные остатки, которые не вносят существенный вклад во взаимодействие с Т-клеточным рецептором, могут быть модифицированы заменой на 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: 4, 29 и 30

Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO. 4	S	V	D	V	S	P	P	K	V
Варианты									I
									L
									A
		L							I
		L							L
		L							
		L							A
		A							I
		A							L
		A							
		A							A
		M							I
		M							L
		M							
		M							A
		T							I
		T							L
		T							
		T							A
	Q							I	
	Q							L	
	Q								
	Q							A	
Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO. 29	F	L	Q	E	Y	L	D	A	I
Варианты		I							L
		I							V
		I							
		I							A
		M							L
		M							V
		M							
		M							A
		A							L
		A							V
		A							
		A							A
		V							L
		V							V
		V							
		V							A
		T							L
		T							V
		T							
		T							A
	Q							L	
	Q							V	
	Q								
	Q							A	
Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9

SEQ ID NO. 30	V	V	D	E	G	P	T	G	V
Варианты									L
									I
									A
		M							L
		M							I
		M							
		M							A
		L							L
		L							I
		L							
		L							A
		A							L
		A							I
		A							
		A							A
		T							L
		T							I
		T							
		T							A
		Q							L
	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	Н-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
Н-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 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 заме-

щенные пептиды достигают половины максимального роста лизиса относительно фона, составляет не более чем около 1 мМ, предпочтительно не более чем около 1 мкМ, более предпочтительно не более чем около 1 нМ и еще более предпочтительно не более чем около 100 пМ и наиболее предпочтительно не более чем около 10 пМ. Также предпочтительно, чтобы замещенный пептид распознавался Т-клетками более чем одного индивида, по меньшей мере двух и более предпочтительно трех индивидов.

В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения пептид состоит или по существу состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 67.

"Состоит, по существу, из" подразумевает, что пептид в соответствии с настоящим изобретением, помимо любой из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 67, или его вариант содержит дополнительные находящиеся на N- и/или C-конце фрагменты последовательности аминокислот, которые не являются обязательно формирующими часть пептида, которая функционирует как эпитоп для молекул МНС.

Тем не менее, эти фрагменты могут быть важны для обеспечения эффективного введения пептида 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 антигенассоциированной инвариантной цепи (р33, в дальнейшем "Ii") HLA-DR, как взятый из банка данных NCBI, инвентарный номер - GenBank Accession-number X00497. В других видах слияния пептиды по настоящему изобретению могут быть слиты с антителом, описанным в настоящем документе, или его функциональной частью, в частности встроены в последовательность антитела, так чтобы быть специфической мишенью указанного антитела, или, например, слиты с или встроены в антитело, являющееся специфичным для дендритных клеток, описанных в настоящей заявке.

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

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

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

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

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

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

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

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

Распространено также избирательное восстановление дисульфидных связей в белках. Дисульфидные связи могут быть образованы и окислены во время тепловой обработки биофармацевтических средств. К-реагент Вудворда может использоваться для модификации определенных остатков глутаминовой кислоты. N-(3-(диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимид может использоваться для образования внутримолекулярных поперечных связей между остатком лизина и остатком глутаминовой кислоты. Например, диэтилпирокарбонат является реагентом для модификации гистидильных остатков в белках. Гистидин может также быть модифицирован при использовании 4-гидрокси-2-ноненаля. Реакция остатков лизина и других α -аминных групп полезна, например, при связывании пептидов с поверхностями или поперечной сшивке белков/пептидов. Лизин является сайтом присоединения поли(этилен)гликоля 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 (BPN-скатол).

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

Пептид или вариант, в котором пептид модифицирован или включает непептидные связи, является предпочтительным вариантом осуществления изобретения. Как правило, пептиды и варианты (по меньшей мере те, что содержат пептидные связи между аминокислотными остатками) могут быть синтезированы Fmoc-полиамидным способом твердофазного синтеза пептидов, как раскрыто у Lukas и соавт. (Lukas et al., 1981) и в прилагающихся ссылках. Временная защита N-аминогруппы производится 9-флуоренилметилоксикарбонильной (Fmoc) группой. Повторное расщепление этой высокощелочлабильной защитной группы осуществляется при использовании 20% пиперидина в N,N-диметилформамиде. Функциональные группы боковой цепи могут быть защищены получением таких соединений, как их бутиловые эфиры (в случае серина, треонина и тирозина), бутиловые сложные эфиры (в случае глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты), бутилоксикарбонильное производное (в случае лизина и гистидина), тритильное производное (в случае цистеина) и производное 4-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфонила (в случае аргинина). Если 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 легкорасщепляемой связи пептида и смолы используется нестойкое к действию кислот производное 4-гидроксиметилфеноксисуksусной 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-дициклогексилкарбодиимид/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%-ной 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 комбина-

ция 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 рака поджелудочной железы ($N=18$ A*02-положительный образец), 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 раком поджелудочной железы.

Технологическая платформа лекарственных средств, находящаяся 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 опухолевой ткани рака поджелудочной железы были очищены, и HLA-ассоциированные пептиды были выделены и проанализированы методом ЖХ-МС (см. примеры). Все TUMAP, содержащиеся в настоящей патентной заявке, были идентифицированы с помощью этого подхода на образцах первичного рака поджелудочной железы, что подтверждает их презентацию на клетках первичного рака поджелудочной железы.

Пептиды TUMAP, идентифицированные на многочисленных тканях рака поджелудочной железы и нормальных тканях, 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 выравни-

вание времени удерживания и нормализация.

В настоящем изобретении предложены пептиды, которые пригодны для лечения раковых заболеваний/опухолей, предпочтительно рака поджелудочной железы, клетки которых презентируют в избытке или исключительно пептиды по изобретению. Как показал масс-спектрометрический анализ, эти пептиды естественно презентировались молекулами HLA на образцах первичного рака поджелудочной железы 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 поджелудочной железы или другие нормальные клетки ткани, демонстрирующие высокую степень ассоциации исходных генов с опухолью (см. пример 2). Более того, сами пептиды в высшей степени избыточно презентируются на опухолевой ткани - понятие "опухолевая ткань" в связи с настоящим изобретением подразумевает образец ткани пациента, страдающего от рака поджелудочной железы, но не на нормальных тканях (см. пример 1).

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

Было показано, что пептиды по настоящему изобретению способны стимулировать Т-клеточные ответы и/или избыточно презентируются и поэтому могут использоваться для получения антител и/или ТКР, такие как растворимые ТКР, в соответствии с настоящим изобретением (см. примеры 3 и 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 презентируются на нормальных тканях в сравнимом количестве копий, предотвращая, тем самым, риск нежелательных аутоиммунных реакций против нормальных клеток у пациента.

"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 подобные, так и неорганические кислоты, например соляную кислоту, бромистоводородную кислоту, серную кислоту, азотную кислоту, фосфорную кислоту и тому подобные. И наоборот, приготовление основных солей кислотных компонентов, которые могут присутствовать на пептиде, производится при использовании фармацевтически приемлемого основания, такого как гидроксид натрия, гидроксид калия, гидроксид аммония, гидроксид кальция, триметиламин и тому подобных.

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

Предпочтительно, если медикамент по настоящему изобретению является иммунотерапевтическим препаратом, таким как вакцина. Она может вводиться непосредственно пациенту, в пораженный орган или системно в/к, в/м, п/к, в/б и в/в или вноситься *ex vivo* в клетки, полученные от пациента, или в человеческую клеточную линию, которые затем могут вводиться пациенту или использоваться *in vitro* для селекции субпопуляции из иммунных клеток, полученных от пациента, которые после этого вновь вводятся пациенту. Если нуклеиновая кислота введена в клетки *in vitro*, то может быть полезно, чтобы клетки были трансфицированными, чтобы совместно экспрессировать иммуностимулирующие цитокины,

такие как интерлейкин-2. Пептид может быть, по существу, чистым или в комбинации с иммуностимулирующим адъювантом (см. ниже) или использоваться в комбинации с иммуностимулирующими цитокинами или же вводиться с подходящей системой доставки, например липосомами. Пептид может быть также конъюгирован с подходящим носителем, таким как гемоцианин фиссуреллы (KLH) или маннан (см. WO 95/18145 и (Longenecker et al., 1993)). Пептид может быть также меченым или может быть слитым белком или гибридной молекулой. Пептиды, последовательность которых дана в настоящем изобретении, как ожидается, стимулируют CD4+ или CD8+ Т-клетки. Тем не менее, стимуляция CD8 Т-клеток более эффективна в присутствии поддержки, предоставляемой CD4 хелперными Т-клетками. Таким образом, для эпитопов 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: 67, и по меньшей мере один дополнительный пептид, предпочтительно от двух до 50, более предпочтительно от двух до 25, еще более предпочтительно от двух до 20 и наиболее предпочтительно два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать или восемнадцать пептидов. Пептид(ы) может(могут) быть получен(ы) из одного или более специфических ТАА и может(могут) связываться с молекулами МНС I класса.

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

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

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

В желаемом способе модификации ДНК, кодирующей полипептид по изобретению, используется полимеразная цепная реакция, как раскрыто в работе Saiki RK, 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, желательно ли поддержание в эписомальной или интеграционной форме.

Как правило, ДНК вводится в вектор экспрессии, такой как плаزمид, с соответствующей ориентацией и правильной рамкой считывания для экспрессии. Если необходимо, то ДНК может быть соединена с соответствующими нуклеотидными последовательностями, обеспечивающими координацию транскрипции и трансляции, распознаваемыми желательным хозяином, хотя такие контрольные элементы обычно имеются в векторе экспрессии. Вектор вводится затем хозяину стандартными способами. Как правило, не все хозяева трансформируются вектором. Поэтому будет необходимо выделить трансформи-

рованные 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 плаزمид 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 (Ylps) 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, 3×FLAG, c-мус 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 f1. Векторы, содержащие лидерную последовательность препротрипсина (PPT), могут направлять секрецию слитых белков FLAG в культуральной среде для очистки с использованием антител к FLAG, смол и планшетов. Другие векторы и системы экспрессии для применения с различными клетками-хозяевами хорошо известны из уровня техники.

В другом предпочтительном варианте осуществления кодирования 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 Джолла, 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 кле-

ток-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, 2 изд., ISBN 978-1-58829-262-9 и другой литературе, известной специалисту данной области.

Трансформация соответствующих клеток-хозяев с помощью ДНК-конструкции по настоящему изобретению производится при помощи хорошо известных способов, которые обычно зависят от типа используемого вектора. Относительно трансформации прокариотических клеток-хозяев см., например, работу Cohen и соавт. (Cohen et al., 1972) и (Green and Sambrook, 2012). Трансформация дрожжевых клеток описывается в работе Sherman и соавт. (Sherman et al., 1986). Также подходит метод Бигса (Beggs) (Beggs, 1978). Что касается клеток позвоночных, то подходящие для трансфекции таких клеток реагенты, например фосфат кальция и DEAE-декстран или липосомальные составы, имеются в наличии в Stratagene Cloning Systems или Life Technologies Inc., Гейтерсберг, Мэриленд 20877, США. Электропорация также подходит для трансформации и/или трансфекции клеток и хорошо известна из уровня техники для трансформации дрожжевых клеток, бактериальных клеток, клеток насекомых и клеток позвоночных.

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

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

В предпочтительном варианте осуществления клетка-хозяин является антигенпрезентирующей клеткой, в частности дендритной клеткой или антигенпрезентирующей клеткой. АПК, нагруженные рекомбинантным слитым белком, содержащим простатическую 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 HRPС (гормон-рефрактерного рака предстательной железы), протекающего бессимптомно или с минимально выраженными симптомами (сипулейсел-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, внутривенного (в/б) введения, внутримышечного (в/м) введения. Предпочтительные способы введения пептидов включают п/к, в/к, в/б, в/м и в/в. Предпочтительные способы введения ДНК включают в/к, в/м, п/к, в/б и в/в. Вводиться могут, к примеру, дозы от 50 мкг до 1,5 мг, предпочтительно от 125 до 500 мкг пептида или ДНК в зависимости от соответствующего пептида или ДНК. Дозировка в данном диапазоне успешно использовалась в предыдущих клинических исследованиях (Walter et al., 2012).

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

Медикамент по изобретению может также включать один или более адъювантов. Адъюванты - это вещества, которые неспецифически усиливают или потенцируют иммунный ответ (например, иммунные ответы, опосредованные CD8-положительными Т-клетками или хелперными Т-клетками (ТН) на антиген, и могут, таким образом, рассматриваться как полезные в медикаменте по настоящему изобретению. Подходящие адъюванты включают, но без ограничения, 1018 ISS, соли алюминия, AMPLIVAX®, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, 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, ОМ-174, ОМ-197-МР-ЕС, ОНТАК, 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 адъюванты, такие как Detox компании Ribic, Quil или Superfos. Предпочтительными адъювантами являются такие, как адъювант Фрейнда или ГМ-КСФ. Несколько иммунологических адъювантов (например, MF59), специфических для дендритных клеток, и их получение были описаны ранее (Allison and Krummel, 1995). Также могут использоваться цитокины. Несколько цитокинов были непосредственно соотнесены с влиянием на миграцию дендритных клеток к лимфоидным тканям (например, TNF-), ускоряя созревание дендритных клеток до эффективных, презентующих антиген Т-лимфоцитам, клеток (например, ГМ-КСФ, ИЛ-1 и ИЛ-4) (патент США № 5849589, специально включенный сюда в полном объеме путем ссылки) и действуя как иммуноадъюванты (например, ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-23, ИЛ-7, ИНФ-альфа, ИНФ-бета) (Gabrilovich et al., 1996).

Об иммуностимулирующих олигонуклеотидах CpG также сообщалось, что они усиливают эффекты адъювантов в составе вакцин. Не желая быть связанными соответствием какой-либо конкретной теории, авторы полагают, что CpG-олигонуклеотиды при активации врожденной (не приобретенной) иммунной системы действуют с помощью Toll-подобных рецепторов (TLR), в основном, TLR9. Вызванная CpG активация TLR9 усиливает 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 TH1 и интенсивной выработке цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) даже при отсутствии помощи со стороны CD4 Т-клеток. Активация TH1, вызванная стимуляцией TLR9, сохраняется даже в присутствии вакцинных адъювантов, таких как квасцы или неполный адъювант Фрейнда (IFA), которые обычно способствуют активации TH2. CpG-олигонуклеотиды проявляют даже большую адъювантную активность, если они входят в состав или вводятся в организм вместе с другими адъювантами или в таких составах, как микрочастицы, наночастицы, липидные эмульсии, или в подобных составах, которые в особенности необходимы для инициации сильного ответа, если антиген относительно слаб. Они также ускоряют иммунную реакцию и позволяют снизить дозы антигена приблизительно на два порядка в сравнении с ответами антитела на полную дозу вакцины без CpG, что наблюдалось в некоторых экспериментах (Krieg, 2006). В патенте США № 6406705 B1 описывается комбинированное применение CpG-олигонуклеотидов, адъювантов, не включающих нуклеиновые кислоты, и антигена для вызывания антигенспецифического иммунного ответа. Антагонистом CpG TLR9 является dSLIM (иммуномодулятор со структурой типа двуцепочечный стебель-петля) компании Mologen (Берлин, Германия), который является предпочтительным компонентом фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Также могут быть использованы другие молекулы, связывающиеся с TLR, такие как TLR 7, TLR 8 и/или TLR 9, связывающиеся с РНК.

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

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

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

В предпочтительном варианте осуществления фармацевтической композиции в соответствии с изо-

бретением адьювант 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 адьювантом является циклофосфамид, имиквимод или резиквимод. Еще более предпочтительными адьювантами 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 антигенную детерминанту (например, комплекс пептида с МНС в соответствии с настоящей патентной заявкой). В другом варианте осуществления каркас способен активировать пути передачи сигнала за счет его антигена-мишени, например антигена комплекса Т-клеточного рецептора. Каркасы включают, но без ограничения, антитела и их фрагменты, антигенсвязывающие домены антитела, включающие вариабельный участок тяжелой цепи антитела и вариабельный 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 уничтожить клетку, несущую специфическую мишень, не способен уничтожить другую клетку без специфической мишени, но презентующую другой(ие) комплекс(ы) пептида с МНС. Связывание с другими комплексами пептида с МНС не играет роли, если пептид перекрестно реагирующего комплекса пептида с МНС не является встречающимся в природе, т.е. не образован из человеческого HLA-пептидома. Испытания для оценки потенциала уничтожения клетки-мишени хорошо известны из уровня техники. Они должны проводиться с использованием клеток-мишеней (первичные клетки или клеточные линии) с неизменной презентацией комплексов пептида с МНС или клеток, нагруженных пептидами, таким образом, что будет достигаться уровень встречающихся в природе комплексов пептида с МНС.

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

ного 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 2014/071978 A1 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 мРНК, 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 67, 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 гисто-

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

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

Настоящее изобретение относится к пептиду, включающему последовательность, которая выбирается из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 67 или их варианта, который по меньшей мере на 88% гомологичен (предпочтительно, если он идентичен) последовательности с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 67 или их варианта, 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 67 или их варианта, который по меньшей мере на 88% гомологичен (предпочтительно, идентичен) SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 67, 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: 67.

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

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

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

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

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

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

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 67 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 эф-

фективного 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 способу применения в соответствии с изобретением, где указанные раковые клетки являются клетками рака поджелудочной железы или клетками других солидных или гематологических опухолей, таких как рак поджелудочной железы, рак головного мозга, рак почки, толстой кишки или прямой кишки, лейкоза.

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 рака поджелудочной железы. 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 рака поджелудочной железы, доставляют токсин к клетке рака поджелудочной железы, экспрессирующей раковый ген-маркер на повышенном уровне и/или ингибируют активность полипептида-маркера рака поджелудочной железы) в соответствии с настоящим изобретением.

Если возможно, антитела по изобретению могут быть куплены в коммерческих источниках. Антитела по изобретению могут быть также получены при использовании хорошо известных способов. Опытному специалисту будет понятно, что для получения антител по изобретению могут использоваться как полипептидные маркеры рака поджелудочной железы полной длины, так и их фрагменты. Полипептид, необходимый для получения антитела по изобретению, может быть частично или полностью очищенным из природного источника или же может быть получен с использованием методики рекомбинантной ДНК.

Например, кДНК, кодирующая пептид в соответствии с настоящим изобретением, такой как пептид с последовательностью с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 67, полипептид или вариант или его фрагмент, может быть экспрессирована в прокариотических клетках (например, бактерий) или эукариотических клетках (например, дрожжей, насекомых или клетках млекопитающих), после чего рекомбинантный белок может быть очищен и использован в получении препарата из моноклональных или поликлональных антител, которые специфически связываются с полипептидным маркером рака поджелудочной железы, 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 из, по существу, гомогенной популяции антител, т.е. отдельные антитела внутри популяции идентичны, за исключением возможных естественных мутаций, которые могут быть представлены в небольших количествах. Моноклональные антитела в контексте настоящего изобретения специфически включают "химерные" антитела, в которых участок тяжелой и/или легкой цепей 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 гибридного метода. В рамках гибридного метода мышь или другое подходящее животное-хозяин обычно иммунизируется иммунизирующим веществом, чтобы инициировать лимфоциты, которые вырабатывают или способны вырабатывать антитела, которые будут специфически связываться с иммунизирующим веществом. Альтернативно лимфоциты могут быть иммунизированы *in vitro*.

Моноклональные антитела могут быть также получены с помощью технологий рекомбинантных ДНК, таких как описываемые в патенте США № 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 участка (CDR) реципиента замещены остатками из CDR биологических видов, не являющихся человеком (донорское антитело), таких как мыши, крысы или кролики, имеющими желаемую специфичность, аффинность и связывающая способность. В некоторых случаях остатки Fv-каркаса (FR) человеческого иммуноглобулина замещены соответствующими остатками нечеловеческого происхождения. Гуманизированные антитела могут также включать остатки, которые не встречаются ни в антителе-реципиенте, ни в импортированном CDR или каркасных последовательностях. Как правило, гуманизированное антитело будет включать по сути все из по меньшей мере одного и, как правило, двух переменных доменов, в которых все или, по существу, все участки CDR соответствуют таковым нечеловеческого иммуноглобулина, и все или по сути все из участков FR являются таковыми консенсусной последовательности иммуноглобулина человека. Оптимально, чтобы гуманизированное антитело содержало также по меньшей мере часть константного участка иммуноглобулина (Fc), как правило, человеческого иммуноглобулина.

Способы гуманизации нечеловеческих антител хорошо известны из уровня техники. В целом, гуманизированное антитело имеет один или более аминокислотных остатков, 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 иммуниза-

ции 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, внутривнутрибрюшинно, 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 таких решений под силу специалисту данной области. Специалистам данной области будет понятно, что дозировка антител, которые должны быть введены, будет варьироваться в зависимости от, например, субъекта, которому будет вводиться антитело, способа введения, конкретного типа используемого антитела и других вводимых медикаментов. Типичная дневная дозировка антитела, используемого отдельно, может варьироваться от около 1 мкг/кг вплоть до 100 мг/кг массы тела или более в день в зависимости от факторов, упоминаемых выше. После введения антитела, предпочтительно для лечения рака поджелудочной железы, эффективность терапевтического антитела может быть оценена различными способами, известными компетентному специалисту данной области. Например, размер, количество и/или распределение рака у субъекта, проходящего лечение, может контролироваться с помощью стандартных методов визуализации опухоли. Введенное в терапевтических целях антитело, которое блокирует рост опухоли, приводит к уменьшению размера и/или предотвращает развитие новых опухолей в сравнении с течением болезни, которое бы имело место без введения антитела, и является эффективным антителом для лечения рака.

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

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 (Kd) ниже чем 1×10 мкМ.

Антитела для диагностических целей могут помечаться зондами, подходящими для обнаружения различными способами визуализации. Способы обнаружения зондов включают, но без ограничения,

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

Другой аспект настоящего изобретения включает способ получения активированных Т-клеток *in vitro*, причем способ включает контактирование Т-клеток *in vitro* с нагруженными антигеном молекулами МНС человека, экспрессированными на поверхности подходящей антигенпрезентирующей клетки на период времени, достаточного для активации 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 ТАР или имеется его пониженный уровень или пониженная функциональная активность. Подходящие клетки с дефицитом пептидного транспортера ТАР включают Т2, RMA-S и клетки дрозофилы. ТАР - это транспортер, связанный с процессингом антигена.

Линия человеческих клеток с недостаточностью Т2, на которые загружаются пептиды, имеется в наличии в Американской коллекции типовых культур, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, США под каталожным номером CRL 1992; клеточная линия дрозофилы, линия Schneider 2 имеется в наличии в ATCC под каталожным номером CRL 19863; клеточная линия мышцы RMA-S описывается в работе Ljunggren и соавт. (Ljunggren and Karre, 1985).

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

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

Если антигенпрезентирующая клетка трансфицирована для экспрессии такого эпитопа, то предпочтительно, чтобы клетка включала вектор экспрессии, способный экспрессировать пептид, содержащий SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 67 или вариант такой аминокислотной последовательности.

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

При получении Т-клеток могут быть также использованы аллогенные клетки, и этот способ подробно описывается в патентной заявке WO 97/26328, включенной сюда путем ссылки. Например, кроме клеток дрозофилы 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 и соавт. (Porta et al., 1994), в которой описывается раз-

работка 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: 67.

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; предпочтительно по меньшей мере в 2 раза и более предпочтительно по меньшей мере в 5 или 10 раз выше уровня, представленного в нормальной ткани.

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

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

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

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

В настоящем изобретении предложен также медикамент, который полезен в лечении рака, в частности рака поджелудочной железы и других злокачественных заболеваний.

В настоящем изобретении также предложен комплект, включающий:

(а) контейнер, который содержит фармацевтическую композицию, как описанная выше, в виде раствора или в лиофилизированной форме;

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

(в) факультативно - инструкции по (i) применению раствора или (ii) восстановлению раствора и/или по применению лиофилизованного 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 многократного применения. Фармацевтическая ком-

позиция 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 адьюванты (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, внутривенный, 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 рака поджелудочной железы, медикамент по изобретению предпочтительно используется для лечения рака поджелудочной железы.

Кроме того, настоящее изобретение далее относится к способу получения персонализированного фармацевтического препарата для отдельного пациента, включающему 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 раком поджелудочной железы с различными HLA-A, HLA-B и HLA-C аллелями. Оно может содержать пептиды, связанные с молекулами МНС I класса и МНС II класса, или удлиненные пептиды, связанные с молекулами МНС I класса. Помимо опухолеассоциированных пептидов, собранных из нескольких тканей рака поджелудочной железы, 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 заключения относительно статуса иммунокомпетентности пациента.

Пептиды TUMAP для хранилища были идентифицированы с помощью интегрированного подхода функциональной геномики, комбинирующего анализ экспрессии генов, масс-спектрометрию и Т-клеточную иммунологию (XPresident®). Этот подход гарантирует, что только те пептиды TUMAP, которые действительно присутствуют в большом проценте опухолей, но не экспрессируются или экспрессируются лишь минимально на нормальной ткани, были выбраны для последующего анализа. В целях первоначального отбора пептидов образцы ткани рака поджелудочной железы 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 (рак поджелудочной железы) 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 раком поджелудочной железы.

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), презентруемых опухолевым образцом отдельного пациента; (б) сравнение идентифицированных на этапе (а) пептидов с хранилищем (банком данных) пептидов, как описано выше; и (в) выбор по меньшей мере одного пептида из хранилища (банка данных), который коррелирует с опухолеассоциированным пептидом, идентифицированным у пациента. Например, пептиды TUMAP, презентруемые опухолевым образцом, идентифицируют с помощью (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 aberrантно; 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 aberrантно 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 aberrантно; 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 aberrантно экспрессируемых опухолью. В качестве другого примера могут быть идентифицированы белки, имеющие мутации, являющиеся уникальными для опухолевого образца, соотносимого с соответствующей нормальной тканью отдельного пациента, и могут быть идентифицированы пептиды TUMAP, специфической мишенью которых является мутация. Например, геном опухоли и соответствующей нормальной ткани могут быть секвенированы методом полногеномного секвенирования: для обнаружения несинонимичных мутаций на кодирующих белок участках генов геномную ДНК и РНК экстрагируют из опухолевых тканей, а нормальную не имеющую мутаций геномную ДНК зародышевой линии экстрагируют из мононуклеарных клеток периферической крови (МПК). Применяемый подход секвенирования нового поколения (NGS) заключается в повторном секвенировании кодирующих белок участков (повторное секвенирование экзома). В этих целях экзонную ДНК из человеческих образцов фиксируют с помощью поставляемых изготовителем наборов для обогащения целевыми фрагментами, за чем следует секвенирование, например, с помощью системы HiSeq2000 (Illumina). В дополнение к этому опухолевую мРНК секвенируют для прямого количественного определения геномной экспрессии и подтверждения того, что мутировавшие гены экспрессированы в опухолях пациентов. Считывание полученных в результате миллионов последовательностей осуществляется алгоритмами программного обеспечения. Получаемый список содержит мутации и экспрессию генов. Опухолеспецифические соматические мутации определяют сравнением с вариантами зародышевой линии из МПК и устанавливают приоритетность. Идентифицированные *de novo* пептиды могут быть затем испытаны на иммуногенность, как описывается выше в случае хранилища, и пептиды-кандидаты TUMAP, обладающие подходящей иммуногенностью, выбирают для включения в вакцину.

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

В отдельном варианте осуществления изобретения пептиды, включенные в вакцину, идентифицируют с помощью (а) идентификации опухолеассоциированных пептидов (TUMAP), презентруемых опухолевым образцом отдельного пациента; и (б) выбора по меньшей мере одного пептида, идентифицированного *de novo* на этапе (а) и подтверждения его иммуногенности.

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

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

Конечный нерасфасованный раствор разливают во флаконы и хранят при -20°C до использования. Один флакон содержит 700 мкл раствора, содержащего 0,578 мг каждого пептида. Из них 500 мкл (прибл. 400 мкг на пептид) будут вводить с помощью 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 рака поджелудочной железы, и так как было определено, что данные пептиды не присутствуют или присутствуют в небольшом количестве в нормальных тканях, то эти пептиды могут быть использованы для диагностики наличия рака.

Присутствие заявленных пептидов на тканевых биоптатах и в образцах крови может помочь патоморфологу в постановке диагноза рака. Выявление конкретных пептидов с помощью антител, масс-спектрометрии или других методов, известных из уровня техники, могут дать патоморфологу свидетельства того, что образец ткани является злокачественной или воспаленной или пораженной заболеванием вообще или же может использоваться в качестве биомаркера рака поджелудочной железы. 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, адаптивным 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 обследования 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.

На фиг. 1А-С представлена избыточная презентация различных пептидов в нормальных тканях (темно-серый цвет) и тканях рака поджелудочной железы (светло-серый цвет). На фиг. 1D показаны все клеточные линии (темно-серый цвет), нормальные ткани (серый цвет) и раковые ткани (светло-серый цвет), на которых был выявлен отдельный пептид (FLFDGSANLV) (SEQ ID NO: 9). Фиг. 1А ген: CTLA/CTLB, пептид: FLAQQESEI (A*02) (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, 4 пищевода, 2 желчных пузыря, 3 сердца, 12 почек, 4 образца лейкоцитов, 19 печеней, 43 легких, 1 лимфатический узел, 1 яичник, 2 периферических нерва, 1 брюшина, 1 гипофиз, 3 плевры, 1 предстательная железа, 6 прямых кишок, 3 скелетных мышцы, 3 образца кожи, 2 тонких кишки, 4 селезенки, 5 желудков, 1 семенник, 2 вилочковые железы, 3 щитовидные железы, 2 матки, 2 вены, 6 поджелудочных желез, 18 раков поджелудочной железы; фиг. 1В ген: PLEC, пептид: SLQEENVAVA (A*02), (SEQ ID NO.: 2); 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, 4 пищевода, 2 желчных пузыря, 3 сердца, 12 почек, 4 образца лейкоцитов, 19 печеней, 43 легких, 1 лимфатический узел, 1 яичник, 2 периферических нерва, 1 брюшина, 1 гипофиз, 3 плевры, 1 предстательная железа, 6 прямых кишок, 3 скелетных мышцы, 3 образца кожи, 2 тонких кишки, 4 селезенки, 5 желудков, 1 семенник, 2 вилочковые железы, 3 щитовидные железы, 2 матки, 2 вены, 6 поджелудочных желез, 18 раков поджелудочной железы; фиг. 1С ген: COL6A3, пептид: FLVDGSSAL (A*02) (SEQ ID NO: 10); 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, 4 пищевода, 2 желчных пузыря, 3 сердца, 12 почек, 4 образца лейкоцитов, 19

печеней, 43 легких, 1 лимфатический узел, 1 яичник, 2 периферических нерва, 1 брюшина, 1 гипофиз, 3 плевры, 1 предстательная железа, 6 прямых кишок, 3 скелетных мышцы, 3 образца кожи, 2 тонких кишки, 4 селезенки, 5 желудков, 1 семенник, 2 вилочковые железы, 3 щитовидные железы, 2 матки, 2 вены, 6 поджелудочных желез, 18 раков поджелудочной железы; фиг. 1D COL6A3, пептид: FLFDGSANLV (A*02) (SEQ ID NO: 9); ткани слева направо: 5 клеточных линий рака предстательной железы, 7 нормальных тканей (1 толстая кишка, 6 легких), 85 раковых тканей (2 рака молочной железы, 6 раков толстой кишки, 4 рака пищевода, 3 рака печени, 56 раков легких, 5 раков поджелудочной железы, 3 рака прямой кишки, 1 меланома, 5 раков желудка). Набор нормальных тканей был таким же, как и в А-С, но ткани, на которых пептид не был выявлен, не показаны. Несовпадения относительно списка видов опухолей между фиг. 1D и табл. 4, возможно, обусловлены более строгими критериями отбора, применявшимися в случае табл. 4 (более подробная информация представлена в табл. 4). На фиг. 1D представлены все образцы с поддающейся обнаружению презентацией пептида Y вне зависимости от параметров избыточной презентации и технической проверки качества образца.

На фиг. 1E -1 показаны все клеточные линии (темно-серый цвет), нормальные ткани (серый цвет) и раковые линии (светло-серый цвет), на которых были выявлены отдельные пептиды. Фиг. 1E пептид: SVDVSPPKV (A*02) (SEQ ID NO: 4); ткани слева направо: 1 клеточная линия, 3 первичные культуры, 1 кожа, 1 рак желчных протоков, 3 рака головного мозга, 1 рак молочной железы, 4 рака пищевода, 5 раков почки, 11 раков легких, 1 рак лимфатических узлов, 1 рак яичника, 3 рака поджелудочной железы, 1 рак предстательной железы, 3 рака кожи, 2 рака мочевого пузыря, 3 рака матки; фиг. 1F пептид: LLVDDSFLLHTV (A*02) (SEQ ID NO: 5); ткани слева направо: 2 клеточные линии, 1 первичная культура, 1 рак желчных протоков, 2 рака головного мозга, 1 рак молочной железы, 3 рака пищевода, 2 рака желчного пузыря, 2 рака почки, 2 рака печени, 3 рака легких, 7 раков яичника, 2 рака поджелудочной железы, 3 рака кожи, 1 рак желудка, 1 рак матки, фиг. 1G пептид: IVDDLTINL (A*02) (SEQ ID NO: 8); ткани слева направо: 1 клеточная линия, 1 рак толстой кишки, 2 рака пищевода, 2 рака желчного пузыря, 5 раков легких, 1 рак лимфатического узла, 1 рак поджелудочной железы, 2 рака кожи, 4 рака желудка, 1 рак мочевого пузыря, 4 рака матки, фиг. 1H пептид: LLAGQTYHV (A*02) (SEQ ID NO: 13); ткани слева направо: 6 клеточных линий, 1 легкое, 1 плацента, 2 рака желчных протоков, 3 рака молочной железы, 2 рака толстой кишки, 2 рака пищевода, 2 рака желчного пузыря, 1 рак печени, 36 раков легких, 3 рака яичника, 3 рака поджелудочной железы, 1 рак прямой кишки, 3 рака мочевого пузыря; и фиг. 1I пептид: VLA-KPGVISV (A*02) (SEQ ID NO: 14); ткани слева направо: 7 клеточных линий, 1 легкое, 1 рак желчных протоков, 4 рака молочной железы, 1 рак толстой кишки, 2 рака пищевода, 1 рак желчного пузыря, 36 раков легких, 1 рак яичника, 3 рака поджелудочной железы, 2 рака прямой кишки, 1 рак желудка, 1 рак мочевого пузыря.

На фиг. 2 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 клетках рака поджелудочной железы, для панели нормальных тканей (темно-серый цвет) и 11 образцов рака поджелудочной железы (серый). Фиг. 2A LAMC2; ткани слева направо: 1 надпочечная железа, 1 артерия, 1 костный мозг, 1 головной мозг (целиком), 1 молочная железа, 1 толстая кишка, 1 пищевод, 1 сердце, 3 почки, 1 образец лейкоцитов, 1 печень, 1 легкое, 1 лимфатический узел, 1 яичник, 1 поджелудочная железа, 1 плацента, 1 предстательная железа, 1 слюнная железа, 1 скелетная мышца, 1 кожа, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 семенник, 1 вилочковая железа, 1 щитовидная железа, 1 мочевой пузырь, 1 шейка матки, 1 матка, 1 вена, 18 раков поджелудочной железы; фиг. 2B VCAN; ткани слева направо: 1 надпочечная железа, 1 артерия, 1 костный мозг, 1 головной мозг (целиком), 1 молочная железа, 1 толстая кишка, 1 пищевод, 1 сердце, 3 почки, 1 образец лейкоцитов, 1 печень, 1 легкое, 1 лимфатический узел, 1 яичник, 1 поджелудочная железа, 1 плацента, 1 предстательная железа, 1 слюнная железа, 1 скелетная мышца, 1 кожа, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 семенник, 1 вилочковая железа, 1 щитовидная железа, 1 мочевой пузырь, 1 шейка матки, 1 матка, 1 вена, 18 раков поджелудочной железы; фиг. 2C FAP; ткани слева направо: 1 надпочечная железа, 1 артерия, 1 костный мозг, 1 головной мозг (целиком), 1 молочная железа, 1 толстая кишка, 1 пищевод, 1 сердце, 3 почки, 1 образец лейкоцитов, 1 печень, 1 легкое, 1 лимфатический узел, 1 яичник, 1 поджелудочная железа, 1 плацента, 1 предстательная железа, 1 слюнная железа, 1 скелетная мышца, 1 кожа, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 семенник, 1 вилочковая железа, 1 щитовидная железа, 1 мочевой пузырь, 1 шейка матки, 1 матка, 1 вена, 18 раков поджелудочной железы.

На фиг. 3 показаны типичные данные по иммуногенности: результаты проточного цитометрического анализа после пептидспецифического окрашивания мультимеров. На фиг. 3C и 3D представлены отдельные результаты пептидспецифических 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 SeqID No 3 (C, левая секция) или пептидом с последовательностью Seq ID No 50 (D, левая секция) соответственно. После трех циклов стимуляции обнаружение клеток, реагирующих с пептидом, производилось с помощью двойного окрашивания мультимеров A*02/Seq ID No 3 (C) или A*02/Seq ID No 50 (D). Правые секции (C и D) представляют собой контрольное окрашивание клеток, простимулированных нерелевантными

ми 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 компаний Asterand (Детройт, США и Ройстон, Хартфордшир, Великобритания); Geneticist Inc. (Глендейл, Калифорния, США); Университетской клиники г. Гейдельберг; Университетской клиники г. Тюбинген. Нормальные ткани были получены из компаний Bio-Options Inc. (Калифорния, США); BioServe (Белтсвилль, Мэриленд, США); Capital BioScience Inc. (Роквилл, Мэриленд, США); Geneticist Inc. (Глендейл, Калифорния, США); Университетской клиники г. Женевы; Университетской клиники г. Гейдельберг; Медицинского университета префектуры Киото (KPU); Университетской клиники г. Мюнхена; компании ProteoGenex Inc. (Калвер-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 BV7.2 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), снабженных источником ESI. Пулы пептидов наносили непосредственно на аналитическую микрокапиллярную колонку из плавленого кварца (75 мкм в/д×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 наноESI. Масс-спектрометры LTQ-Orbitrap работали в информационно-зависимом режиме с применением стратегии TOP5. Вкратце, цикл сканирования начинался с полного сканирования с высокой точностью масс на спектрометре Orbitrap (R=30 000), за чем следовало сканирование MS/MS также на Orbitrap (R=7500) на 5 особенно многочисленных ионах-предшественниках с динамическим исключением отобранных ранее ионов. Tandемные масс-спектры 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 вариативности 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 вариативность репликатов. В профиле сравниваются образцы раковой ткани поджелудочной железы с фоновым уровнем образцов нормальной ткани. Профили презентации типичных пептидов, презентуемых в избытке, показаны на фиг. 2. Показатели презентации отдельных пептидов показаны в табл. 8.

Таблица 8

Показатели презентации

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептида
1	FLAQQESEI	+++
2	SLQEEHVAVA	++
3	ALLTFMEQV	+++
4	SVDVSPPKV	+
5	LLVDDSFSLHTV	+++
7	AQQESEIAGI	+++
8	IVDDLTINL	+++
9	FLFDGSANLV	+++
10	FLVDGSSAL	+++
11	FLYKIIDEL	+++
12	FVSEIVDTV	+++
13	LLAGQTYHV	++
14	VLAKPGVISV	+
15	SLANNVTSV	+
16	APVNVTTTEVKSV	+++
17	FLKSGDAIV	+++
18	SLLDDELMSL	++
19	HLAPETDEDDL	+++
20	RLAGDGVGAV	++
21	HLMDQPLSV	+++
23	SLSAFTFL	+
24	GLLEELTV	+++
25	SLKEEVGEEAI	+
26	SLKEEVGEEAIV	++
29	FLQEYLDAI	+++
31	SLAAAAGKQEL	+++
32	SLAAAAGKQELA	+++
33	SLDSRLELA	+++
34	MLMPVHFLL	+++
35	VMDSGDGVTHTV	+
36	KQEYDESGPSIVH	+++
37	GLLKKINSV	+++
38	NLVEKTPALV	+++
39	TLLSNLEEA	+
40	FILDSAETTTL	+++
41	FLLDGSEGV	+++
42	KLVDKSTEL	+++
43	RLDQRPQI	++
46	TFAPVNVTTTEVKSV	+
47	KMDASLGNLFA	+++
48	ALTQTGGPHV	+++
49	NLKGTFATL	+++
50	ALAAILTRL	+++
51	ALMLQGVDL	+++
52	RMVEEIGVEL	++
56	GLLDYATGAIGSV	+++
57	FLGKVVIDV	+++
58	GLAAFKAFL	+++
59	KLFNLSKEDDV	+++
61	ALEKDYEEVGV	+++
62	ALEKDYEEV	+++
63	FAGDDAPR	+++
64	FLVSNMLLAEA	+++
66	ALLSGLREA	+++
67	KMFFLIDKV	+++
68	KLLTEVHAA	+++
70	FLVDGSWSV	+++
71	FLLDGSANV	+++
74	KIQEILTQV	+++
75	RLDDLKMTV	++
76	RLLDVSRSL	+
77	GLTDNIHLV	+++
79	VLAPRVLRA	+
80	TLYPHTSQV	+
81	AMSSKFFLV	+++
82	SISDVIAQV	+++
83	FLIDSSEGV	+++
84	NLLLDLYEL	+++
85	TVAEVIQSV	++
86	SLLAQNTSWLL	++
87	LLLGSPAAA	+++

В таблице представлены пептиды, которые в очень высокой степени избыточно презентуются на опухолях в сравнении с панелью нормальных тканей (+++), в высокой степени избыточно презентуются на опухолях в сравнении с панелью нормальных тканей (++) или избыточно презентуются на опухолях в сравнении с панелью нормальных тканей (+).

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 пепти-

ды являются опухолеспецифическими, несмотря на присутствие их исходных белков также и в нормальных тканях. Тем не менее, выявление профилей экспрессии мРНК приносит дополнительный уровень безопасности при отборе пептидных мишеней для иммунотерапии. В особенности в случае терапевтических методов с высокой степенью риска для безопасности, таких как ТКР с созревшей аффинностью, идеальный целевой пептид будет получен из белка, являющегося уникальным для опухоли и не встречающегося на нормальных тканях.

Источники и приготовление РНК.

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

Суммарная РНК здоровых 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., Фарминггейл, Нью-Йорк, США) для чипов U133A или набора GeneChip IVT Labelling Kit (Affymetrix) для чипов U133 Plus 2.0 с последующей фрагментацией, гибридизацией кРНК и окрашиванием стрептавидин-фикоэритрином и биотинилированным антистрептавидиновым антителом (Molecular Probes, Лейден, Нидерланды). Изображения сканировали на Agilent 2500A GeneArray Scanner (U133A) или Affymetrix GeneChip Scanner 3000 (U133 Plus 2.0), а данные анализировали в программе GCOS (Affymetrix) с использованием настроек по умолчанию для всех параметров. Для нормализации использовались 100 служебных генов, предоставленных Affymetrix. Относительные значения экспрессии были подсчитаны из отношений логарифмов зарегистрированных сигналов, полученных компьютерной программой, а значение для образца нормальной почки было произвольно задано значением 1,0. Типичные профили экспрессии исходных генов, предложенных в настоящем изобретении, которые в высокой степени экспрессированы в избытке или исключительно экспрессированы в клетках рака поджелудочной железы, представлены на фиг. 1. Показатели экспрессии других отдельных генов показаны в табл. 9.

Таблица 9

Показатели экспрессии		
SEQ ID No	Последовательность	Экспрессия гена
3	ALLTFMEQV	++
4	SVDVSPPKV	+
6	VLISLKQAPLV	+
13	LLAGQTYHV	+
15	SLANNVTSV	+
16	APVNVTTVEVKSV	+
20	RLAGDGVGAV	+
23	SLSAFTLFL	+
25	SLKEEVGEEAI	++
27	YLQGQRLDNV	+
30	VVDEGPTGV	++

36	KQEYDESGPSIVH	+
43	RLDQRVPQI	+
44	VLLDKIKNLQV	+
46	TFAPVNVVTEVKSV	++
47	KMDASLGNLFA	+
48	ALTQTGGPHV	+
50	ALAAILTRL	+++
51	ALMLQGVDL	++
52	RMVEEIGVEL	+
57	FLGKVVIDV	+
58	GLAAFKAFL	+
59	KLFNLSKEDDV	+
61	ALEKDYEEVGV	+++
62	ALEKDYEEV	+++
66	ALLSGLREA	++
67	KMFFLIDKV	+
71	FLLDGSANV	+
73	TLVAIVVGV	++
75	RLDDLKMTV	++
76	RLLDSVSRL	+++
78	TLSSIKVEV	+++
81	AMSSKFFLV	++

В таблице представлены пептиды 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 (+).

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

Для получения информации об иммуногенности пептидов TUMAP по настоящему изобретению заявители провели исследования с использованием прайминга Т-клеток *in vitro* на основе повторных стимуляций CD8⁺ Т-клеток искусственными антигенпрезентирующими клетками (иАПК), нагруженными комплексами пептид-МНС и антителом к CD28. Таким образом заявители могли показать иммуногенность для 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 8 различных молекул pMHC для каждого цикла считывания.

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

pMHC, использованные для положительных и отрицательных контрольных стимуляций, были A*0201/MLA-001 (пептид ELAGIGILTV (SEQ ID NO: 88) из модифицированного Melan-A/MART-1) и A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVNI из DDX5 (SEQ ID NO: 89)) 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 ТСМ с добавлением 80 ед/мл ИЛ-2, и инкубация была продолжена в течение 4 дней при 37°C. Данный цикл стимуляций производили в общей сложности три раза. Для считывания с рМНС-мультимеров использовали 8 различных молекул рМНС на цикл. Использовался двумерный комбинаторный подход к кодировке, как было описано ранее (Andersen et al., 2012), с незначительными изменениями, относящимися к мечению с 5 различными флуорохромами. Наконец, проводили анализ мультимеров посредством окрашивания клеток набором для определения жизнеспособности клеток при воздействии ближнего ИК-излучения с красителем Live/dead (Invitrogen, Карлсруэ, Германия), клоном SK1 антител CD8-FITC (BD, Гейдельберг, Германия) и мультимерами рМНС с флуоресцентными метками. Для анализа использовали цитометр BD LSRII SORP, снабженный подходящими лазерами и фильтрами. Пептидспецифические 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 мультимерположительных 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 мультимерположительных среди CD8-положительных Т-клеток и процентная доля специфичных мультимерположительных клеток была по меньшей мере в 10 раз выше медианного значения стимуляций отрицательного контроля).

Иммуногенность *in vitro* для пептидов рака поджелудочной железы.

Для проанализированных пептидов, связанных с молекулами HLA I класса, иммуногенность *in vitro* могла быть продемонстрирована генерированием пептидспецифических Т-клеточных линий. Типичные результаты проточного цитометрического анализа после TUMAP-специфического окрашивания мультимеров для 2 пептидов по изобретению показаны на фиг. 3 вместе с соответствующими отрицательными контролями. Результаты для 2 пептидов по изобретению обобщаются в табл. 10.

Таблица 10

Иммуногенность *in vitro* пептидов HLA I класса по изобретению

Seq ID	лунки	доноры
69	++	++++
87	+	+++

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

Результаты для 7 дополнительных пептидов по изобретению обобщаются в табл. 10B.

Таблица 10B

Иммуногенность пептидов по изобретению HLA I класса *in vitro*

Seq ID No	Последовательность	Положительные лунки [%]
3	ALLTFMEQV	++
20	RLAGDGVGAV	++++
21	HLMDQPLSV	+
23	SLSAFTLFL	++
34	MLMPVHLL	+
37	GLLKKINSV	+
50	ALAAILTRL	+++

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

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 ELL-

SA на основе обнаружения легкой цепи ($\beta 2m$) стабилизированных комплексов с МНС. Этот анализ производили, в основном, как описано у Rodenko и соавт. (Rodenko et al., 2006).

В 96-луночные планшеты MAXISorp (NUNC) на ночь вносили 2 мкг/мл стрептавидина в PBS при комнатной температуре, промывали 4 раза и блокировали в течение 1 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.

Таблица 11

Показатели связывания с молекулами МНС I класса

SEQ ID No	Последовательность	Пептидный обмен
1	FLAQQESEI	++
2	SLQEEHVAVA	++
3	ALLTFMEQV	+++
4	SVDVSPPKV	++
5	LLVDDSFHTV	+++
6	VLISLKQAPLV	++
7	AQQESEIAGI	++
8	IVDDLTINL	++
9	FLFDGGSANLV	++
10	FLVDGSSAL	++
11	FLYKIIDEL	+++
12	FVSEIVDTV	+++
13	LLAGQTYHV	++
14	VLAKPGVISV	++
15	SLANNVTSV	++
16	APVNVTTTEVKSV	++
17	FLKSGDAIV	++
18	SLLDDELMSL	++
20	RLAGDGVGAV	++
21	HLMDQPLSV	++
22	TLDGAAVNQV	++
23	SLSAFTLFL	++
24	GLLEELVTV	++
25	SLKEEVGEEAI	++
26	SLKEEVGEEAIV	++
27	YLQGGRLDNV	++
28	YLQGGRLDNVV	++
29	FLQEYLDI	+++
30	VVDEGPTGV	++
31	SLAAAAGKQEL	++
32	SLAAAAGKQELA	+
33	SLDSRLELA	++
34	MLMPVHFL	++++
35	VMDSGDGVTHTV	++
37	GLLKKINSV	++
38	NLVEKTPALV	+++
39	TLLSNLEEA	++
40	FILDSAETTL	++
41	FLLDGSEGV	+++
42	KLVDKSTEL	++
43	RLDQRPQI	++
44	VLLDKIKNLQV	++
46	TFAPVNVTTTEVKSV	++
47	KMDASLGNLFA	++++
48	ALTQTGGPHV	++
49	NLKGTFATL	+
50	ALAAILTRL	+++
51	ALMLQGVDL	++
52	RMVEEIGVEL	++
53	SSFGLGGGGSV	+
54	VLLSEIEVA	++

55	YLDAMMNEA	++
56	GLLDYATGAIGSV	+++
57	FLGKVVIVDV	++++
58	GLAAFKAFL	+++
59	KLFNLSKEDDV	++
60	YLEEDVYQL	++
64	FLVSNMLLAEA	+++
65	YLYDSETKNA	++
66	ALLSGLREA	+++
67	KMFFLIDKV	+++

<20%=+; 20-49%=++; 50-75%=+++; ≥75%=++++

Список цитируемой литературы.

- Agesen, T. H. et al., Gut 61 (2012)
- Alhumaidi, A., Indian J Dermatol.Venereol.Leprol. 78 (2012)
- Allison, J. P. et al., Science 270 (1995)
- Amatschek, S. et al., Cancer Res 64 (2004)
- Andersen, R. S. et al., Nat.Protoc. 7 (2012)
- Appay, V. et al., Eur.J Immunol. 36 (2006)
- Appetecchia, M. et al., J Exp.Clin Cancer Res 29 (2010)
- Arafat, H. et al., Surgery 150 (2011)
- Ariga, N. et al., Int J Cancer 95 (2001)
- Baek, G. et al., Cell Rep. 9 (2014)
- Bai, L. et al., J Cell Biochem. 113 (2012)
- Banchereau, J. et al., Cell 106 (2001)
- Bausch, D. et al., Clin Cancer Res 17 (2011)
- Beatty, G. et al., J Immunol 166 (2001)
- Beggs, J. D., Nature 275 (1978)
- Bell, J. L. et al., Cell Mol Life Sci. 70 (2013)
- Benjamini, Y. et al., Journal of the Royal Statistical Society.Series B (Methodological), Vol.57 (1995)
- Bera, T. K. et al., Cancer Res 66 (2006)
- Berndt, S. I. et al., Nat Genet. 45 (2013)
- Blanch, A. et al., PLoS.One. 8 (2013)
- Blenk, S. et al., BMC.Cancer 8 (2008)
- Bo, H. et al., BMC.Cancer 13 (2013)
- Bouameur, J. E. et al., J Invest Dermatol. 134 (2014)
- Boulter, J. M. et al., Protein Eng 16 (2003)
- Braumuller, H. et al., Nature (2013)
- Brendle, A. et al., Carcinogenesis 29 (2008)
- Brossart, P. et al., Blood 90 (1997)
- Brown, S. G. et al., Prostate 75 (2015)
- Bruckdorfer, T. et al., Curr.Pharm.Biotechnol. 5 (2004)
- Calmon, M. F. et al., Neoplasia. 11 (2009)
- Cao, H. H. et al., Oncotarget. (2014)
- Cappello, F. et al., Curr.Pharm.Des 19 (2013)
- Cappello, F. et al., Cancer Biol.Ther 7 (2008)
- Cappello, F. et al., Front Biosci. (Schol.Ed) 3 (2011)
- Capulli, M. et al., J Bone Miner.Res 27 (2012)
- Card, K. F. et al., Cancer Immunol Immunother. 53 (2004)
- Casagrande, G. et al., Haematologica 91 (2006)
- Catanzaro, J. M. et al., Nat Commun. 5 (2014)
- Chang, K. W. et al., Anticancer Res. 31 (2011)
- Chang, K. W. et al., Hepatol.Res 36 (2006)
- Chanock, S. J. et al., Hum.Immunol. 65 (2004)

Chaudhury, A. et al., *Nat Cell Biol.* 12 (2010)

Che, C. L. et al., *Int J Clin Exp.Pathol.* 6 (2013)

Chen, B. et al., *Cancer Lett.* 354 (2014a)

Chen, Q. et al., *PLoS.One.* 9 (2014b)

Chen, R. et al., *Lab Invest* 95 (2015)

Chen, S. et al., *Cancer Epidemiol.* 37 (2013a)

Chen, S. T. et al., *Cancer Sci.* 102 (2011)

Chen, Y. L. et al., *Int J Surg.* 11 (2013b)

Cheon, D. J. et al., *Clin Cancer Res* 20 (2014)

Cheung, H. C. et al., *BMC.Genomics* 9 (2008)

Choi, W. I. et al., *Cell Physiol Biochem.* 23 (2009)

Chow, S. N. et al., *Eur.J Gynaecol.Oncol* 31 (2010)

Cine, N. et al., *Oncol Rep.* 32 (2014)

Clement, S. et al., *Virchows Arch.* 442 (2003)

Cohen, C. J. et al., *J Mol Recognit.* 16 (2003a)

Cohen, C. J. et al., *J Immunol* 170 (2003b)

Cohen, S. J. et al., *Pancreas* 37 (2008)

Cohen, S. N. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 69 (1972)

Coligan JE et al., (1995)

Colombetti, S. et al., *J Immunol.* 176 (2006)

Croner, R. S. et al., *Int J Cancer* 135 (2014)

Csiszar, A. et al., *Breast Cancer Res* 16 (2014)

Cucchiarelli, V. et al., *Cell Motil.Cytoskeleton* 65 (2008)

Culler, M. D., *Horm.Metab Res* 43 (2011)

Delaval, B. et al., *Nat Cell Biol.* 13 (2011)

Dengjel, J. et al., *Clin Cancer Res* 12 (2006)

Denkberg, G. et al., *J Immunol* 171 (2003)

Derycke, L. et al., *Int J Dev.Biol.* 55 (2011)

Dhup, S. et al., *Curr.Pharm.Des* 18 (2012)

Draoui, N. et al., *Dis.Model.Mech.* 4 (2011)

Dutton-Regester, K. et al., *Genes Chromosomes.Cancer* 51 (2012)

Egloff, A. M. et al., *Cancer Res* 66 (2006)

Ellis, M. J. et al., *Nature* 486 (2012)

Falk, K. et al., *Nature* 351 (1991)

Feng, H. et al., *J Clin Invest* 124 (2014)

Fillmore, R. A. et al., *Exp.Biol.Med. (Maywood.)* 239 (2014)

Findeis-Hosey, J. J. et al., *Biotech.Histochem.* 87 (2012)

Fong, L. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98 (2001)

Franz, M. et al., *J Oral Pathol.Med.* 39 (2010)

Fu, Y. et al., *Cancer Biol.Ther* 5 (2006)

Gabrilovich, D. I. et al., *Nat Med.* 2 (1996)

Galmarini, C. M. et al., *Br.J Cancer* 88 (2003)

Gamez-Pozo, A. et al., *PLoS.One.* 7 (2012)

Gao, H. J. et al., *J Cancer Res Clin Oncol* (2014a)

Gao, J. et al., *PLoS.One.* 9 (2014b)

Gao, Z. H. et al., *Histopathology* 65 (2014c)

Gardina, P. J. et al., *BMC.Genomics* 7 (2006)

Garg, M. et al., *J Clin Endocrinol.Metab* 99 (2014)

Gattinoni, L. et al., *Nat Rev.Immunol* 6 (2006)

Geyik, E. et al., *Gene* 540 (2014)

Glen, A. et al., *Prostate* 70 (2010)

Glymph, S. et al., *Infect.Genet.Evol.* 16 (2013)

Gnjatic, S. et al., *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100 (2003)

Godkin, A. et al., *Int.Immunol* 9 (1997)

Gong, Y. et al., *Adv.Anat.Pathol.* 21 (2014)

Gorlov, I. P. et al., *Cancer Res* 67 (2007)

Green MR et al., 4th, (2012)

Greenfield EA, 2nd, (2014)

Guo, C. et al., *Clin Chim.Acta* 417 (2013)

Guo, C. et al., *Nat Commun.* 6 (2015)

Gutgemann, A. et al., *Arch.Dermatol.Res* 293 (2001)

Hait, W. N. et al., *Trans.Am Clin Climatol.Assoc.* 117 (2006)

Han, J. C. et al., *World J Surg.Oncol* 13 (2015)

Hao, X. et al., *J Membr.Biol.* 247 (2014)

He, X. et al., *Neoplasma* 61 (2014)

He, X. et al., *Cancer Res* 68 (2008)

Hoffmann, N. E. et al., *Cancer* 112 (2008)

Hopker, K. et al., *EMBO J* 31 (2012a)

Hopker, K. et al., *Cell Cycle* 11 (2012b)

Horibe, T. et al., *Chembiochem.* 15 (2014)

Horinouchi, M. et al., *Pediatr.Hematol.Oncol* 27 (2010)

Hu, S. et al., *J Cancer Res Clin Oncol* 140 (2014)

Hu, W. et al., *Cell Death.Dis.* 4 (2013)

Huang, H. C. et al., *Technol.Cancer Res Treat.* 9 (2010)

Hurst, J. H. et al., *Cell Mol Biol.Lett.* 14 (2009)

Hussey, G. S. et al., *Mol Cell* 41 (2011)

Hwang, M. L. et al., *J Immunol.* 179 (2007)

Hyung, S. W. et al., *Mol Cell Proteomics.* 10 (2011)

li, M. et al., *Exp.Biol.Med. (Maywood.)* 231 (2006)

Isfort, R. J. et al., *Oncogene* 15 (1997)

Ishiwata, T. et al., *Oncol Rep.* 18 (2007)

Izaki, T. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* 329 (2005)

Jacob, M. et al., *Curr.Mol Med.* 12 (2012)

Jaeger, E. et al., *Nat Genet.* 44 (2012)

Jain, R. et al., *Appl.Immunohistochem.Mol Morphol.* 18 (2010)

Januchowski, R. et al., *Biomed.Res Int* 2014 (2014)

Jeda, A. et al., *Ginekol.Pol.* 85 (2014)

Jeng, Y. M. et al., *Br.J Surg.* 96 (2009)

Jeong, H. C. et al., *J Proteome.Res* 10 (2011)

Jones, A. et al., *EMBO Mol Med.* 5 (2013)

Jung, G. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1987)

Kamino, H. et al., *Cancer Genet.* 204 (2011)

Kaneko, K. et al., *Pancreas* 24 (2002)

Kang, C. Y. et al., *J Gastrointest.Surg.* 18 (2014)

Kang, G. H. et al., *Lab Invest* 88 (2008)

Kanzawa, M. et al., *Pathobiology* 80 (2013)

Karagiannis, G. S. et al., *Oncotarget.* 3 (2012)

Kashyap, M. K. et al., *Cancer Biol.Ther* 8 (2009)

Kashyap, V. et al., *Mol Oncol* 7 (2013)

Katada, K. et al., *J Proteomics.* 75 (2012)

Kevans, D. et al., *Int J Surg.Pathol.* 19 (2011)
 Khalaileh, A. et al., *Cancer Res* 73 (2013)
 Khuon, S. et al., *J Cell Sci.* 123 (2010)
 Kibbe AH, rd, (2000)
 Kido, T. et al., *Genes (Basel)* 1 (2010)
 Kim, M. et al., *Mol Cancer Res* 6 (2008)
 Kim, S. W. et al., *OMICS.* 15 (2011)
 Kirov, A. et al., *J Cell Biochem.* (2015)
 Kojima, M. et al., *PLoS.One.* 9 (2014)
 Koshikawa, K. et al., *Oncogene* 21 (2002)
 Kraya, A. A. et al., *Autophagy.* 11 (2015)
 Krieg, A. M., *Nat Rev.Drug Discov.* 5 (2006)
 Kuramitsu, Y. et al., *Anticancer Res* 30 (2010)
 Kuramitsu, Y. et al., *Anticancer Res* 31 (2011)
 Kuroda, N. et al., *Histol.Histopathol.* 20 (2005)
 Kuroda, N. et al., *Pathol.Int* 63 (2013)
 Kwon, J. et al., *Int J Oncol* 43 (2013)
 Lahsnig, C. et al., *Oncogene* 28 (2009)
 Lee, C. W. et al., *World J Surg.Oncol* 11 (2013a)
 Lee, H. W. et al., *Clin Cancer Res* 19 (2013b)
 Lee, H. W. et al., *Int J Oncol* 41 (2012)
 Lee, K. Y. et al., *J Med.* 35 (2004)
 Lee, M. A. et al., *BMC.Cancer* 14 (2014)
 Leivo, I. et al., *Cancer Genet.Cytogenet.* 156 (2005)
 Leygue, E. et al., *Cancer Res* 58 (1998)
 Li, G. H. et al., *Bioinformatics.* 30 (2014)
 Li, X. et al., *Clin Cancer Res* 20 (2014)
 Li, X. et al., *PLoS.One.* 8 (2013)
 Li, Y. et al., *Cancer Genet.Cytogenet.* 198 (2010)
 Liddy, N. et al., *Nat Med.* 18 (2012)
 Lieveld, M. et al., *Virchows Arch.* 465 (2014)
 Lim, R. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* 406 (2011)
 Lim, W. et al., *J Cancer Prev.* 18 (2013)
 Lin, H. C. et al., *J Proteome.Res* 12 (2013a)
 Lin, L. et al., *Oncol Lett.* 6 (2013b)
 Linge, A. et al., *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 53 (2012)
 Liu, H. et al., *Carcinogenesis* 34 (2013a)
 Liu, M. et al., *Reprod.Sci.* 20 (2013b)
 Liu, X. F. et al., *Apoptosis.* 14 (2009)
 Ljunggren, H. G. et al., *J Exp.Med.* 162 (1985)
 Long, Z. W. et al., *Tumour.Biol.* 35 (2014)
 Longenecker, B. M. et al., *Ann N.Y.Acad.Sci.* 690 (1993)
 Lu, C. et al., *Dig.Dis.Sci.* 58 (2013a)
 Lu, X. et al., *Cancer Biother.Radiopharm.* 28 (2013b)
 Lukas, T. J. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 78 (1981)
 Lund, R. R. et al., *Proteomics.* 12 (2012)
 Lundblad RL, 3rd, (2004)
 Lung, H. L. et al., *Int.J Cancer* 127 (2010)
 Luo, Y. et al., *Mol Med.Rep.* 9 (2014)
 Lv, T. et al., *PLoS.One.* 7 (2012)

- Manning, T. J., Jr. et al., *Cell Motil.Cytoskeleton* 45 (2000)
- Marg, A. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* 401 (2010)
- Matassa, D. S. et al., *Cell Death.Dis.* 4 (2013)
- Matchett, K. B. et al., *Adv.Exp.Med.Biol.* 773 (2014)
- Mazieres, J. et al., *Oncogene* 24 (2005)
- McCluggage, W. G. et al., *Semin.Diagn.Pathol.* 22 (2005)
- McIntyre, J. C. et al., *Nat Med.* 18 (2012)
- Medjkane, S. et al., *Nat Cell Biol.* 11 (2009)
- Meng, F. et al., *Int J Oncol* 43 (2013)
- Menhofer, M. H. et al., *PLoS.One.* 9 (2014)
- Mentlein, R. et al., *Biol.Chem.* 392 (2011)
- Meziere, C. et al., *J Immunol* 159 (1997)
- Milani, C. et al., *BMC.Cancer* 13 (2013)
- Miyagi, T. et al., *Mol Urol.* 5 (2001)
- Mochizuki, S. et al., *Cancer Sci.* 98 (2007)
- Modlin, I. M. et al., *Aliment.Pharmacol.Ther* 31 (2010)
- Morgan, R. A. et al., *Science* 314 (2006)
- Mori, M. et al., *Transplantation* 64 (1997)
- Mortara, L. et al., *Clin Cancer Res.* 12 (2006)
- Mu, Y. et al., *Electrophoresis* 34 (2013)
- Mueller, L. N. et al., *J Proteome.Res* 7 (2008)
- Mueller, L. N. et al., *Proteomics.* 7 (2007)
- Mumberg, D. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96 (1999)
- Mushinski, J. F. et al., *J Biol.Chem.* 284 (2009)
- Nakamura, H. et al., *Curr.Pharm.Des* 19 (2013)
- Nakayama, H. et al., *J Clin Pathol.* 55 (2002)
- Nassar, Z. D. et al., *Oncotarget.* 4 (2013)
- Niedergethmann, M. et al., *Br.J Cancer* 97 (2007)
- Nikolova, D. N. et al., *Oncol Rep.* 20 (2008)
- Nishioka, M. et al., *Oncogene* 19 (2000)
- Olesen, S. H. et al., *Mol Cell Proteomics.* 4 (2005)
- Ou, Y. et al., *Urol.Oncol* 32 (2014)
- Pace, A. et al., *Curr.Pharm.Des* 19 (2013)
- Pan, S. et al., *OMICS.* 13 (2009)
- Panico, F. et al., *Adv.Cancer Res* 105 (2009)
- Patel, R. A. et al., *Cancer Res* 72 (2012)
- Pereira, P. M. et al., *Org.Biomol.Chem.* 12 (2014)
- Pinheiro J et al., (2015)
- Pitule, P. et al., *Anticancer Res* 33 (2013)
- Pivonello, C. et al., *Infect.Agent.Cancer* 9 (2014)
- Plebanski, M. et al., *Eur.J Immunol* 25 (1995)
- Pontisso, P., *Ann Hepatol.* 13 (2014)
- Porta, C. et al., *Virology* 202 (1994)
- Portela-Gomes, G. M. et al., *Regul.Pept.* 146 (2008)
- Qi, Y. et al., *Proteomics.* 5 (2005)
- Qu, Z. et al., *Cancer Med.* 3 (2014)
- Quinn, M. C. et al., *Int J Oncol* 42 (2013)
- Rammensee, H. G. et al., *Immunogenetics* 50 (1999)
- Reddy, S. P. et al., *Clin Cancer Res* 14 (2008)
- RefSeq, The NCBI handbook [Internet], Chapter 18 (2002)

Rehman, I. et al., PLoS.One. 7 (2012)

Rini, B. I. et al., Cancer 107 (2006)

Robinson, T. J. et al., Cell Cycle 12 (2013)

Rock, K. L. et al., Science 249 (1990)

Roman-Gomez, J. et al., Blood 109 (2007)

Roustif, M. M. et al., J Endocrinol. 223 (2014)

Roy, D. et al., Blood 118 (2011)

Rucki, A. A. et al., World J Gastroenterol. 20 (2014)

S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, 032-0100L, (2013)

Saiki, R. K. et al., Science 239 (1988)

Salman, B. et al., Oncoimmunology. 2 (2013)

Sato, Y. et al., J Cell Sci. 126 (2013)

Savoy, R. M. et al., Endocr.Relat Cancer 20 (2013)

Schlomann, U. et al., Nat Commun. 6 (2015)

Schroder, W. A. et al., Cancer Med. 3 (2014)

Schulte, J. et al., Histochem.Cell Biol. 138 (2012)

Scrideli, C. A. et al., J Neurooncol. 88 (2008)

Seeger, F. H. et al., Immunogenetics 49 (1999)

Seya, T. et al., Oncol Rep. 16 (2006)

Sherman F et al., (1986)

Sherman-Baust, C. A. et al., Cancer Cell 3 (2003)

Simiczyjew, A. et al., Histochem.Cell Biol. 142 (2014)

Singh-Jasuja, H. et al., Cancer Immunol.Immunother. 53 (2004)

Skondra, M. et al., Anticancer Res 34 (2014)

Small, E. J. et al., J Clin Oncol. 24 (2006)

Smith, M. J. et al., Br.J Cancer 100 (2009)

Song, B. L. et al., Biochem.J 394 (2006)

Song, Q. et al., Tumour.Biol. 35 (2014)

Sood, A. K., Immunol Res 46 (2010)

Souчек, J. J. et al., Br.J Cancer 111 (2014)

Stolk, J. A. et al., Prostate 60 (2004)

Sturm, M. et al., BMC.Bioinformatics. 9 (2008)

Sun, D. W. et al., Cancer Epidemiol. (2015a)

Sun, J. et al., J Mol Histol. 46 (2015b)

Sun, Z. et al., J Proteome.Res 13 (2014)

Suzuki, H. et al., Int J Oncol 12 (1998)

Szarvas, T. et al., Int J Cancer 135 (2014)

Takahashi, K. et al., Peptides 27 (2006)

Takeuchi, A. et al., Mol Cell Endocrinol. 384 (2014)

Tatenhorst, L. et al., J Neuropathol.Exp.Neurol. 63 (2004)

Terabayashi, T. et al., PLoS.One. 7 (2012)

Terada, T. et al., J Hepatol. 24 (1996)

Teufel, R. et al., Cell Mol Life Sci. 62 (2005)

Thorsen, K. et al., Mol Cell Proteomics. 7 (2008)

Tran, E. et al., Science 344 (2014)

Trougakos, I. P., Gerontology 59 (2013)

Tummala, R. et al., Cancer Chemother.Pharmacol. 64 (2009)

Unger, K. et al., Endocr.Relat Cancer 17 (2010)

Untergasser, G. et al., Mech.Ageing Dev. 126 (2005)

Vassar, R. et al., J Neurochem. 130 (2014)

- Von Hoff, D. D. et al., *N.Engl.J Med.* 369 (2013)
- Vui-Kee, K. et al., *Kaohsiung.J Med.Sci.* 28 (2012)
- Walker, E. J. et al., *World J Gastroenterol.* 20 (2014)
- Walter, S. et al., *J Immunol* 171 (2003)
- Walter, S. et al., *Nat Med.* 18 (2012)
- Wang, G. H. et al., *Oncol Lett.* 5 (2013a)
- Wang, H. et al., *Front Oncol* 4 (2014a)
- Wang, J. et al., *J Exp.Clin Cancer Res* 34 (2015)
- Wang, Q. et al., *PLoS.One.* 8 (2013b)
- Wang, X. et al., *Urol.Int.* 92 (2014b)
- Wang, X. Y. et al., *Int J Hyperthermia* 29 (2013)
- Watson, M. B. et al., *Acta Oncol* 46 (2007)
- Watt, H. L. et al., *Mol Cell Endocrinol.* 286 (2008)
- Weber, A. M. et al., *Pharmacol.Ther* (2014)
- Wikberg, M. L. et al., *Tumour.Biol.* 34 (2013)
- Willcox, B. E. et al., *Protein Sci.* 8 (1999)
- Williams, S. et al., *PLoS.One.* 8 (2013)
- Wong, C. C. et al., *Nat Genet.* 46 (2014)
- World Cancer Report, (2014)
- Xia, Z. K. et al., *Dis.Esophagus.* 25 (2012)
- Xie, X. et al., *Oncol Lett.* 7 (2014)
- Xiong, D. et al., *Carcinogenesis* 33 (2012)
- Xu, C. Z. et al., *Int J Clin Exp.Pathol.* 6 (2013)
- Yang, C. Y. et al., *J Immunol* 192 (2014a)
- Yang, H. et al., *PLoS.One.* 9 (2014b)
- Yang, S. et al., *Biochim.Biophys.Acta* 1772 (2007)
- Yasui, W. et al., *Cancer Sci.* 95 (2004)
- Yeung, T. L. et al., *Cancer Res* 73 (2013)
- Yu, X. et al., *Cancer Res* 73 (2013)
- Yuan, B. et al., *Immunobiology* 217 (2012)
- Yuan, D. et al., *J Surg.Oncol* 108 (2013)
- Yuan, R. H. et al., *Ann Surg.Oncol* 16 (2009)
- Zanaruddin, S. N. et al., *Hum.Pathol.* 44 (2013)
- Zaravinos, A. et al., *PLoS.One.* 6 (2011)
- Zaremba, S. et al., *Cancer Res.* 57 (1997)
- Zhang, C. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* 434 (2013)
- Zhang, C. C. et al., *Cancer Res* 59 (1999)
- Zhang, Y. et al., *Zhonghua Gan Zang.Bing.Za Zhi.* 14 (2006)
- Zhang, Y. et al., *Cancer Lett.* 303 (2011)
- Zhao, D. et al., *J Neurooncol.* 118 (2014)
- Zhao, Z. K. et al., *Tumour.Biol.* 34 (2013)
- Zhu, H. H. et al., *Asian Pac.J Trop.Med.* 7 (2014)
- Zocchi, M. R. et al., *Blood* 119 (2012)
- Zou, T. T. et al., *Oncogene* 21 (2002)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептид, выбранный из i) пептида, состоящего из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 21; ii) пептида, состоящего из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 21, где одна дополнительная аминокислота добавлена к его N- и/или C-концу и iii) фармацевтически приемлемой соли i) или ii).
2. Пептид по п.1, где указанный пептид включает непептидные связи.
3. Антитело, которое специфически распознает пептид по п.1 или 2, предпочтительно когда он связан с молекулой МНС.
4. Т-клеточный рецептор (ТКР), который специфически связывается с НЛА-лигандом в соответст-

вии с SEQ ID NO: 21.

5. ТКР по п.4, где указанный Т-клеточный рецептор несет дополнительную эффекторную функцию, такую как иммуностимулирующий домен или токсин.

6. Нуклеиновая кислота, кодирующая пептид по любому из пп.1 и 2.

7. Нуклеиновая кислота по п.6, которая связана с гетерологичной последовательностью промотора.

8. Клетка-хозяин, включающая пептид по любому из пп.1 и 2, где указанная клетка-хозяин предпочтительно является антигенпрезентирующей клеткой, такой как дендритная клетка, или Т-клетка, или НК-клетка.

9. Способ получения Т-клеточного рецептора по п.4 или 5, где способ включает культивирование клетки-хозяина по п.8, которая презентует пептид по п.1 или включает нуклеиновую кислоту по п.6 или 7, и выделение указанного Т-клеточного рецептора из клетки-хозяина или его культуральной среды.

10. Активированная Т-клетка, полученная с помощью способа, включающего контактирование Т-клеток *in vitro* с нагруженными антигеном молекулами МНС человека I класса, экспрессированными на поверхности подходящей антигенпрезентирующей клетки или искусственной конструкции, имитирующей антигенпрезентирующую клетку, в течение периода времени, достаточного для активации указанных Т-клеток антигенспецифическим образом, где указанный антиген является пептидом по п.1 или 2, которая селективно распознает клетку, которая презентует полипептид, включающий аминокислотную последовательность, указанную в п.1.

11. Применение ТКР по п.4 или 5 в производстве лекарственного средства против рака.

12. Применение по п.11, где указанный рак выбран из группы: рак печени, рак головного мозга, рак почек, рак поджелудочной железы, рак толстой кишки или прямой кишки или лейкоз.

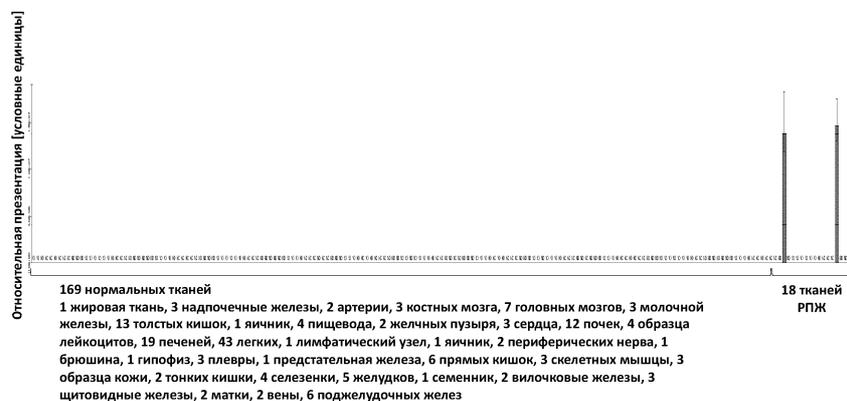
13. Набор для лечения рака, включающий:

(а) контейнер, включающий фармацевтическую композицию, содержащую пептид по любому из пп.1 и 2, антитело по п.3, ТКР по п.4 или 5, нуклеиновую кислоту по п.6 или 7, клетку по п.8 или активированную Т-клетку по п.10, в виде раствора или в лиофилизированной форме; и

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

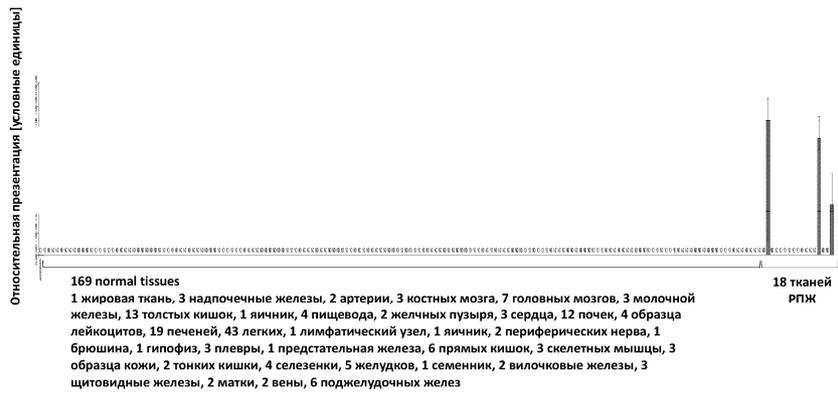
14. Набор по п.13, дополнительно включающий (в) по меньшей мере еще один пептид, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 по 20 и SEQ ID NO: 22 по 87, и/или (г) инструкции по (i) применению раствора или (ii) восстановлению и/или по применению лиофилизированного состава.

Пептид: FLAQQESEI (A*02) SEQ ID NO: 1



Фиг. 1А

Пептид: SLQEEHVAVA (A*02) SEQ ID NO: 2



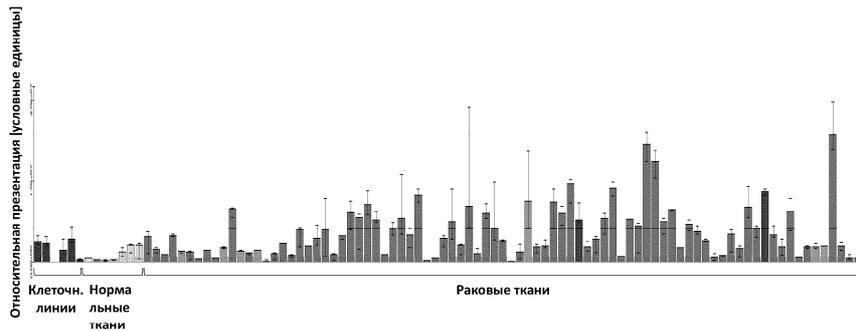
Фиг. 1В

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



Фиг. 1С

Пептид: FLFDGSANLV (A*02) SEQ ID NO: 9

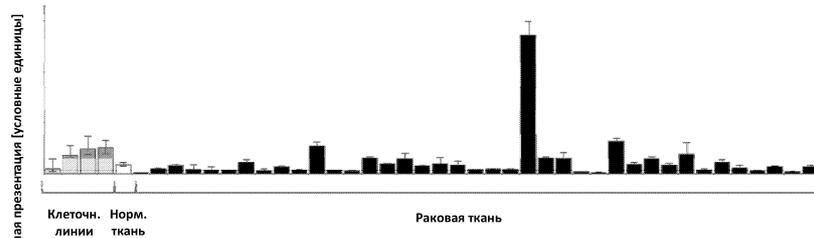


Пептид, выявленный на
 5 клеточных линий рака предстательной железы, 7 нормальных тканей (1 толстая кишка, 6 легких), 85 раковых тканей (2 рака молочной железы, 6 раков толстой кишки, 4 рака пищевода, 3 рака печени, 56 раков легких, 5 раков поджелудочной железы, 3 рака прямой кишки, 1 меланома, 5 раков желудка) (слева направо)

Фиг. 1D

037783

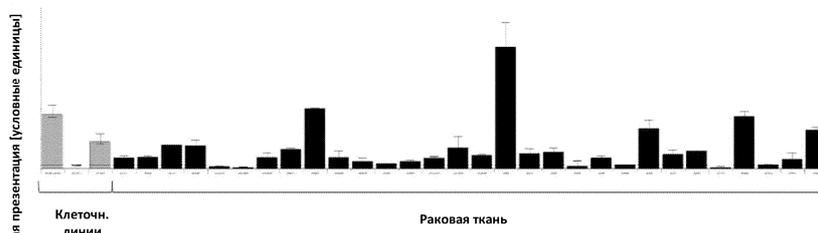
Пептид: SVDVSPPKV (A*02)
SEQ ID NO: 4



Пептид, выявленный на
1 клеточная линия, 3 первичные культуры, 1 кожа, 1 рак желчных протоков, 3 рака головного мозга, 1 рак молочной железы, 4 рака пищевода, 5 раков почки, 11 раков легких, 1 рак лимфатических узлов, 1 рак яичника, 3 рака поджелудочной железы, 1 рак предстательной железы, 3 рака кожи, 2 рака мочевого пузыря, 3 рака матки (слева направо)

Фиг. 1E

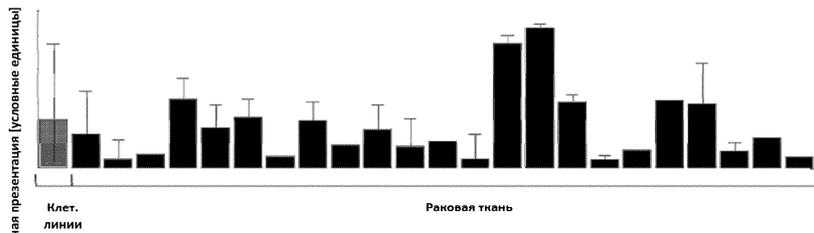
Пептид: LLVDDSFHTV (A*02)
SEQ ID NO: 5



Пептид, выявленный на
2 клеточные линии, 1 первичная культура, 1 рак желчных протоков, 2 рака головного мозга, 1 рак молочной железы, 3 рака пищевода, 2 рака желчного пузыря, 2 рака почки, 2 рака печени, 3 рака легких, 7 раков яичника, 2 рака поджелудочной железы, 3 рака кожи, 1 рак желудка, 1 рак матки (слева направо)

Фиг. 1F

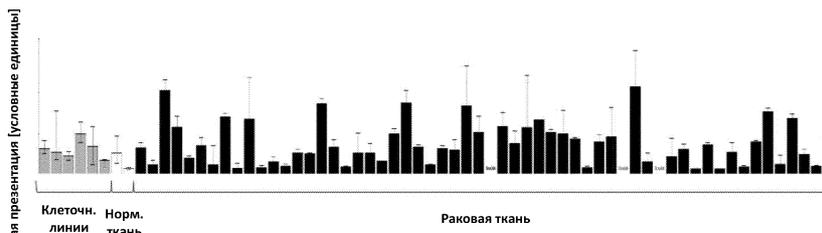
Пептид: IVDDLTLN (A*02)
SEQ ID NO: 8



Пептид, выявленный на
1 клеточная линия, 1 рак толстой кишки, 2 рака пищевода, 2 рака желчного пузыря, 5 раков легких, 1 рак лимфатического узла, 1 рак поджелудочной железы, 2 рака кожи, 4 рака желудка, 1 рака мочевого пузыря, 4 рака матки (слева направо)

Фиг. 1G

Пептид: LLAGQTYHV (A*02)
SEQ ID NO: 13

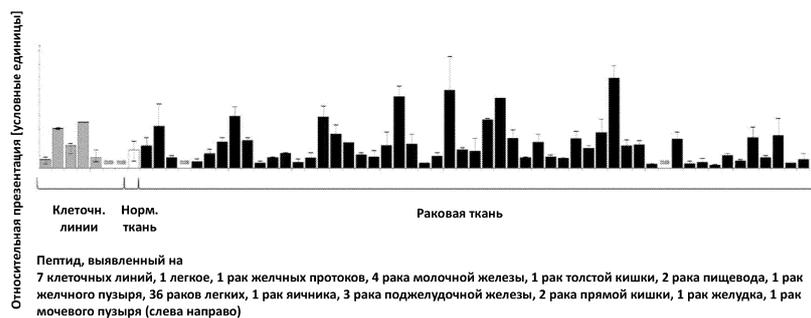


Пептид, выявленный на
6 клеточных линий, 1 легкое, 1 плацента, 2 рака желчных протоков, 3 рака молочной железы, 2 рака толстой кишки, 2 рака пищевода, 2 рака желчного пузыря, 1 рак печени, 36 раков легких, 3 рака яичника, 3 рака поджелудочной железы, 1 рак прямой кишки, 3 рака мочевого пузыря (слева направо)

Фиг. 1H

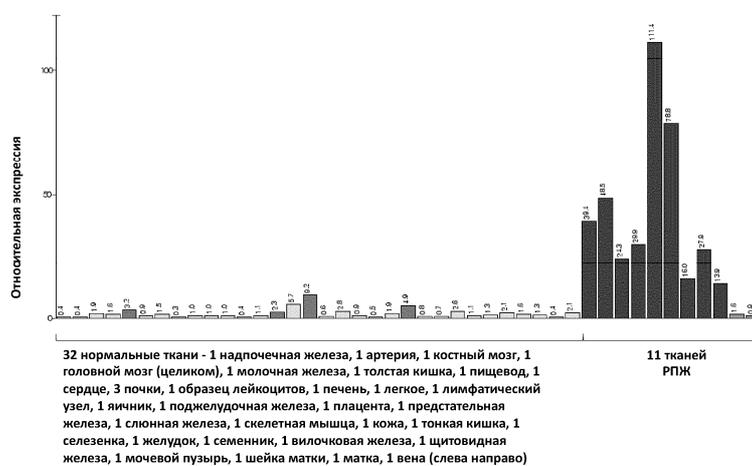
Пептид: VLAKPGVISV (A*02)

SEQ ID NO: 14



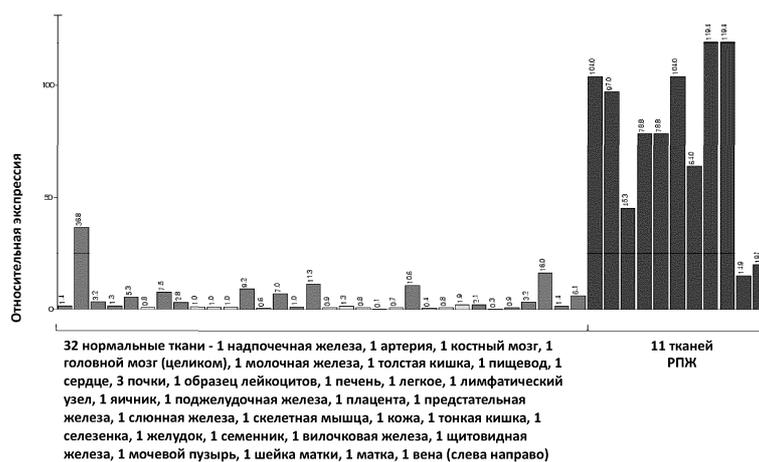
Фиг. 1I

Ген LAM2



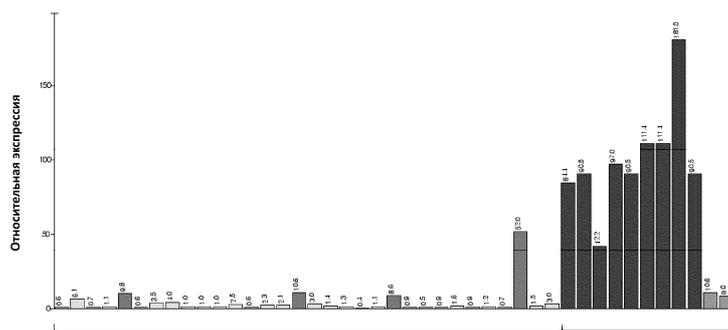
Фиг. 2A

Ген VCAN



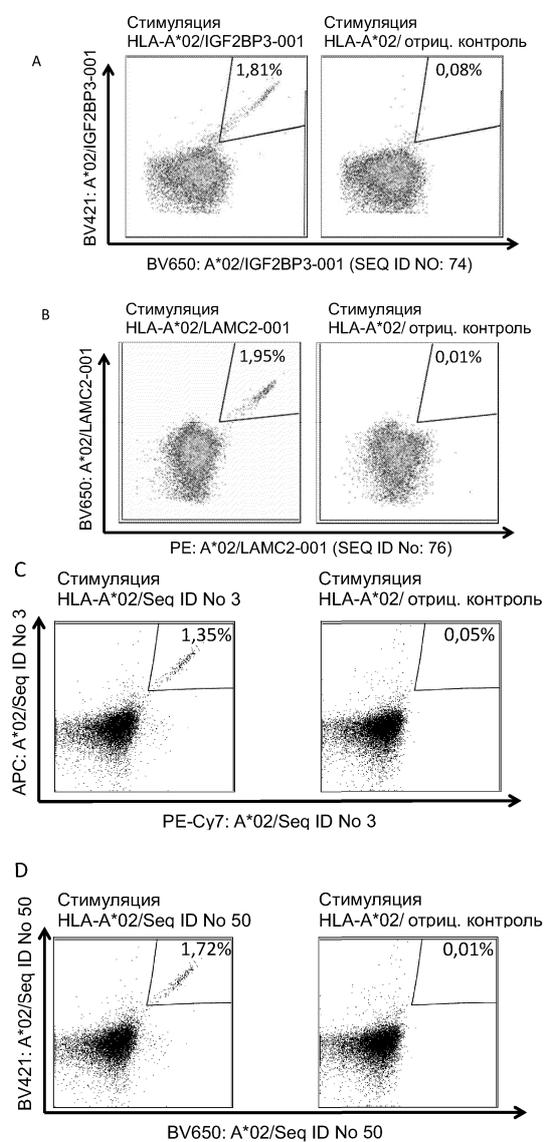
Фиг. 2B

Ген: FAP



32 нормальные ткани - 1 надпочечная железа, 1 артерия, 1 костный мозг, 1 головной мозг (целиком), 1 молочная железа, 1 толстая кишка, 1 пищевод, 1 сердце, 3 почки, 1 образец лейкоцитов, 1 печень, 1 легкое, 1 лимфатический узел, 1 яичник, 1 поджелудочная железа, 1 плацента, 1 предстательная железа, 1 слюнная железа, 1 скелетная мышца, 1 кожа, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 семенник, 1 вилочковая железа, 1 щитовидная железа, 1 мочевой пузырь, 1 шейка матки, 1 матка, 1 вена (слева направо)

Фиг. 2С



Фиг. 3



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2