

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190169** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.05.24

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

(22) Дата подачи заявки
2019.07.30

(54) ИММУНОТЕРАПИЯ РАКОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ РЕСТРИКТИРОВАННЫМИ ПО В*07 ПЕПТИДАМИ И КОМБИНАЦИЯМИ ПЕПТИДОВ И ОТНОСЯЩИЕСЯ К НЕЙ СПОСОБЫ

(31) 10 2018 118 550.2; 62/712,691; 10 2018 119 555.9; 62/717,462

(72) Изобретатель:
**Шустер Хейко, Ковалевски Дэниэл,
Шоор Оливер, Фритше Йенс,
Вайншенк Тони, Сингх Харпреет,
Шиммак Гизела, Рёмер Майкл (DE)**

(32) 2018.07.31; 2018.07.31; 2018.08.10;
2018.08.10

(33) DE; US; DE; US

(86) PCT/EP2019/070430

(74) Представитель:
**Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М.,
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,
Костюшенкова М.Ю., Джермакян Р.В.
(RU)**

(87) WO 2020/025576 2020.02.06

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

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

A1

202190169

202190169

A1

Иммунотерапия раковых заболеваний рестриктированными по В*07 пептидами и комбинациями пептидов и относящиеся к ней способы

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

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

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

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

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

Внутри групп раковых заболеваний головного мозга, лейкоза и рака легких фокус настоящего изобретения особенно направлен на глиобластому (ГБМ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) и острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), немелкоклеточный и мелкоклеточный рак легких (НМРЛ и МРЛ), соответственно.

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

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

ОМЛ является вторым наиболее распространенным видом лейкоза, диагностируемым как у взрослых, так и у детей. Приблизительное число новых

случаев в Соединенных Штатах составляет около 21 000 в год. Пятилетняя выживаемость людей, больных ОМЛ составляет приблизительно 25%.

Рак легких является наиболее распространенным видом рака в мире и основной причиной смерти от рака во многих странах. Рак легких подразделяется на мелкоклеточный и немелкоклеточный рак легких. НМРЛ включает гистологические типы: аденокарцинома, плоскоклеточная карцинома и крупноклеточная карцинома, и на его долю приходится 85% всех случаев заболевания раком легких в США. Возникновение НМРЛ тесно коррелирует с распространением курения, включая курящих в настоящее время и куривших в прошлом, и, как сообщалось, пятилетняя выживаемость составляет 15% (Molina et al., 2008; World Cancer Report, 2014).

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 острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и рака эндометрия в частности.

Также существует необходимость идентифицировать факторы, представляющие собой биомаркеры рака в целом и острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного

рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и рака эндометрия матки в частности, что позволит лучше ставить диагноз, составлять прогноз и предсказывать успех лечения.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

презентировать пептиды экзогенных или трансмембранных белков, которые поглощаются АПК, например, во время эндоцитоза и впоследствии процессируются.

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

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

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

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

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

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

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

Так как оба вида ответов, зависящие от CD8 и от CD4, вносят свой вклад в противоопухолевый эффект сообща и синергически, то идентификация и характеристика опухолеассоциированных антигенов, распознаваемых как CD8+ Т-клетками (лиганд: молекула МНС I класса + пептидный эпитоп), так и CD4-

положительными хелперными Т-клетками (лиганд: молекула МНС II класса + пептидный эпитоп) являются важными при разработке противоопухолевых вакцин.

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

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

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

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

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

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

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

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

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: 383 и с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 499 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: 383 и с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 499, или вариант последовательности, включающий одну консервативную аминокислотную замену в сравнении с последовательностью с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 383 и с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 499, где указанные варианты связываются 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: 383 и с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 499, 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 383 и с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 499, где указанный пептид или его вариант обладает общей длиной, составляющей 8 – 100, предпочтительно 8 – 30 и, наиболее предпочтительно, 8 – 14 аминокислот.

В последующих таблицах представлены пептиды в соответствии с настоящим изобретением, соответствующие им SEQ ID NO. и потенциальные исходные (лежащие в основе) гены для данных пептидов. В Таблице 1а пептиды с последовательностью с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 357 связываются с HLA-B*07. В Таблице 1б пептиды с последовательностью с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 497 связываются с HLA-B*07. Пептиды из Таблицы 2 были раскрыты ранее в виде обширных списков в качестве результатов скринингов с высокой пропускной способностью с высокой долей ошибок или были вычислены с помощью алгоритмов, однако ранее ни в коей мере не были ассоциированы с раковыми заболеваниями. В Таблице 2а пептиды с последовательностью с SEQ ID NO: 358 по SEQ ID NO: 383 связываются с HLA-B*07. В Таблице 2б пептиды с последовательностью с SEQ ID NO: 498 по SEQ ID NO 499 связываются с HLA-B*07. Пептиды из Таблицы 3 являются дополнительными пептидами, которые могут быть полезны в комбинации с другими пептидами по изобретению. В Таблице 3 пептиды с последовательностями с SEQ ID NO: 384 по SEQ ID NO: 445 связываются с HLA-B*07.

Таблица 1а: Пептиды в соответствии с настоящим изобретением.

Seq ID No	Последовательность	Ген(ы)	Аллотип HLA
1	RPRSLQCVSL	KLK2	B*07
2	VPGSDPARYEFL	MAGEA10	B*07
3	MPYVVLTAI	SLC6A3	B*07
4	GPKKFIVKL	TGM4	B*07
5	LPSLSHCSQL	PRAME	B*07
6	LPLNSSTSL	MMP12	B*07

Seq ID No	Последовательность	Ген(ы)	Аллотип HLA
7	RPSQLAPATL	LOC100507003	B*07
8	MPKTNLSKM	LOC100507003	B*07
9	RPDSRLLEL	CTAG2	B*07
10	SPMEAELVRRIL	CTAG2	B*07
11	APLPRPGAV	CTAG2	B*07
12	LPNTGRIGQLL	TGM4	B*07
13	LPNTGRIGQL	TGM4	B*07
14	AVHEIGHSL	MMP12	B*07
15	KPGFNISIL	CYP4Z1, CYP4Z2P	B*07
16	FPAPPAHWF	CYP4Z1, CYP4Z2P	B*07
17	SPAAPLSPASSL	CRH	B*07
18	MALSVLRLLAL	SPINK2	B*07
19	WPRLPGAGL	FAM178B	B*07
20	MVLGIGPVL	SLC45A3	B*07
21	APSRLLEL	LOC645382, LOC645399, PRAMEF10	B*07
22	LPQLKPAL	AMTN	B*07
23	VPRPTSTVGL	TRIM51, TRIM51BP, TRIM51EP, TRIM51HP	B*07
24	VPRPTSTVGLFL	TRIM51, TRIM51BP, TRIM51EP, TRIM51HP	B*07
25	RPQGAVGGL	RHOXF2, RHOXF2B	B*07
26	SPSFSTLLSL	MAGEC1	B*07
27	RIRVTSEVL	ABCC11	B*07
28	LPAPTSLVL	COL20A1	B*07
29	APLRVHITSL	PAEP	B*07
30	YPGFTKRL	ACTL8	B*07
31	RPGPSDPAA	KISS1R	B*07
32	APMAPGRSPL	PGR	B*07
33	LPRGLSPARQL	PGR	B*07
34	APMAPGRSP	PGR	B*07
35	APLPPRAL	COL20A1	B*07
36	RPFSREMDL	FLT3	B*07
37	LPPPRALTL	COL20A1	B*07
38	RPSFPNLTSF	FLT3	B*07
39	QPRPSSEKI	POU4F1, POU4F2, POU4F3	B*07
40	FPRTVKHIDAAL	MMP1	B*07
41	MPAGGGPRSL	CKAP4	B*07

Seq ID No	Последовательность	Ген(ы)	Аллотип HLA
42	APLKMLAL	CCL17	B*07
43	APTPRPKVL	BMPR1B	B*07
44	SPSQTVQRAV	IGHE	B*07
45	TRPWSGPYIL	DCT	B*07
46	QPISGNPVTL	FCRL5	B*07
47	RPRQTGALM	DNTT	B*07
48	RPRYSIGL	BMPR1B	B*07
49	APEKARAFL	SOX14	B*07
50	PEKARAFL	SOX14	B*07
51	SPVFYVQTL	ABCC11	B*07
52	KEDNPSGHTYTL	MAGEB1	B*07
53	SPRIPFSTF	ROPN1	B*07
54	VPSCGRSVEGL	PTHLH	B*07
55	LPALLRSGL	RAPGEF5	B*07
56	LPALLRSGTL	RAPGEF5	B*07
57	APLLPIRTL	UPK2	B*07
58	APLLPIRTLPL	UPK2	B*07
59	KPRTIYSSL	DLX1, DLX4, DLX6	B*07
60	RPYSIYPHGVT	F5	B*07
61	LPRIPFSTF	ROPN1B	B*07
62	KPQSTISGL	F5	B*07
63	FPHMATTAF	HEPHL1	B*07
64	VPRPIFSQLYL	GREB1, GREB1L	B*07
65	FPNVYSTLV	SLC45A2	B*07
66	LPMTVISVL	NMUR2	B*07
67	VPVSRPVL	FCRL2, FCRL3, FCRL5	B*07
68	FPNEVSVVL	HMCN1	B*07
69	RPEDGRPRL	BTBD17	B*07
70	VPAQRLGLL	IGKV1D-43	B*07
71	APFAPLHGGGSL	NEFH	B*07
72	APCNGNVAV	KRT81	B*07
73	LPVSSPVTL	AKNAD1	B*07
74	VPVSHPV	FCRL3, FCRL5	B*07
75	HVRPQTNCI	DCC	B*07
76	KPKVESQAL	ABCC11	B*07
77	QPRLVPGETL	FMN1, LOC101059984	B*07
78	HPSQESPTL	DLX5	B*07
79	GPASDHPSL	GREB1	B*07
80	SALPTTISF	MAGEA4	B*07/B*35

Seq ID No	Последовательность	Ген(ы)	Аллотип HLA
81	IAYPSLREAAL	MAGEA4	B*07/C*03
82	DAAHPGPSV	ALPPL2	B*07/B*51
83	AVSSHNVVI	POTEG	B*07
84	MPMQDIKMI	PRAME	B*07/B*51
85	MPMQDIKMILKM	PRAME	B*07/B*35
86	ALLLRGVTL	SLC6A3	B*07/C*06
87	APVGGNVTSSF	CT45A1, CT45A2, CT45A3, CT45A4, CT45A6, LOC101060208, LOC101060210, LOC101060211	B*07/B*35
88	KPSAVKDSIY	MMP26	B*07/A*26
89	FLIPRAGWLAGL	SLC45A3	B*07/C*06
90	HAIEKAFQL	MMP1	B*07/C*04
91	FPRLVGPdff	MMP11	B*07/B*35
92	TSPLPPTV	ENPP3	B*07
93	SVAIAHGVF	SLC35D3	B*07/B*15
94	LPMSKRQEY	DSCR6	B*07/B*35
95	RTKEEINEL	KRT121P, KRT81, KRT83, KRT85, KRT86	B*07/B*57
96	QPSLVQAIF	ANKRD28	B*07/B*35
97	LPPGTQIQI	ROBO3	B*07
98	FPCSALLACF	FAM107B	B*07/B*35
99	MPVSAFTVI	COL10A1	B*07/B*51
100	TPIPFDKILY	COL10A1	B*07/B*35
101	KPGLPGLK	COL10A1	B*07/C*07
102	MAGPAIHTAPM	DRAXIN	B*07
103	REPIMKADML	MAGEB1	B*07
104	RPLPNSVIHV	TFDP3	B*07
105	RPRYETGVCA	WISP3	B*07
106	APFHIDRLF	NMUR2	B*07
107	GQRLESPGGAA	SOX1	B*07
108	APRGSPPI	FCRL5	B*07
109	LPRALMRST	IGHE	B*07
110	YPSSPASAV	MAGEB17	B*07/B*51
111	YPLQQTNVY	SEMA5B	B*07/B*35
112	YPSPLNKHSF	SEMA5B	B*07/B*35
113	KPHLDRRGAVI	TSPY1, TSPY10, TSPY2, TSPY3, TSPY4, TSPY8	B*07

Seq ID No	Последовательность	Ген(ы)	Аллотип HLA
114	FVPPSGPSNPM	PAX3	B*07
115	KTKSLAQQL	LAMC2	B*07/A*30
116	RSYQHSLRL	LAMC2	B*07/C*07
117	IPHQRSSL	GCSAML	B*07
118	NPERHKPSF	C1orf186	B*07
119	KATEYVHSL	MYCN	B*07/C*16
120	TVRPKNAAL	MYCN	B*07
121	GPFQRAAL	MSX1	B*07
122	KPRTPFTTAQLL	MSX1	B*07
123	RPRLRDLPAL	RAPGEF5	B*07
124	KTIDGHINL	FAM111B	B*07/C*04
125	SPAKQFNIY	FAM111B	B*07/B*35
126	MPREDAHF	MLANA	B*07/B*35
127	KSKQVITLL	ENTHD1	B*07/C*02
128	SPPATLFLFLL	LOXL4	B*07
129	MTLPATTLTL	IGHE	B*07
130	GAYDKARYL	ABCC11	B*07/C*06
131	MPFRNIRSIL	LOC101060288, LOC101060295, LOC101060308, LOC645359, PRAMEF11, PRAMEF15, PRAMEF23, PRAMEF4, PRAMEF5, PRAMEF6, PRAMEF9	B*07
132	LPRLPVGSLV	EPYC	B*07/B*51
133	LPELPTTLTF	EPYC	B*07
134	VAAAARLTL	ITIH6	B*07
135	MPRLLRSL	INSL6	B*07
136	QPDHAGIFRVF	HEPHL1	B*07
137	SPQLSYFEY	LAMC2	B*07/B*35
138	VPFNLITEY	SLC45A2	B*07/B*35
139	LVILQHQAM	NMUR2	B*07/A*26
140	TPFPDIHWF	HMCN1	B*07/B*35
141	YGPYGSWSGW	HRNR	B*07
142	HPFKMKWQY	QRFPR	B*07/B*35
143	YPMIPPAQL	BTBD17	B*07
144	RPVQGIPTY	HMCN1	B*07/B*35
145	VPAQRLGLLL	IGKV1D-43	B*07

Seq ID No	Последовательность	Ген(ы)	Аллотип HLA
146	SPTRGSEF	PTPRZ1	B*07
147	HVAQPAVVL	CTLA4	B*07/C*07
148	KPHLIYRQ	ADAMTS20	B*07
149	SPSSVFTSK	NAT1	B*07
150	APLHGGSLS	NEFH	B*07
151	QPTWNTQTRL	CLNK	B*07
152	SSASFSELFRH	PTPRZ1	B*07
153	QPVHSLCSA	DPCR1	B*07/B*54
154	RPPPSRRAVL	BCAN	B*07
155	APIPRLIEG	CCDC38	B*07
156	GSRPVTGSV	KRT121P, KRT81, KRT83	B*07
157	RPVTGSVC	KRT121P, KRT81, KRT83	B*07
158	SVPVATVEL	ELL3	B*07/C*01
159	TPMTVPRI	KBTBD8	B*07/B*51
160	IPVSHPVLTFF	FCRL3	B*07
161	ASKILETSL	HMCN1	B*07/C*03
162	IPIRVDQNGAF	ADAMTS6	B*07/B*35
163	FRYPNGVSL	RHBG	B*07/C*07
164	RAAGRRLQL	RHBG	B*07
165	RPSKEMQVTI	ONECUT3	B*07
166	YAYTSRVIL	KBTBD8	B*07/C*12
167	NVNPARKGL	DNMT3B	B*07
168	SPSGQRDVSL	ENTHD1	B*07
169	RPFSVSSISQL	HMCN1	B*07
170	APEGKRLGF	FMN1, LOC101059984	B*07
171	LPLGGHKSL	FMN1, LOC101059984	B*07
172	SAQSLHPVL	POU3F4	B*07/C*12
173	VIINNPISL	HMCN1	B*07/C*03
174	IPVTSSVTL	KRTAP24-1	B*07
175	AAFPHKIIF	SPINK13	B*07/C*12/C*02
176	QPLDICHSF	ETV4	B*07/B*35
177	VWEPQGSSRSL	DLX5	B*07
178	VPYYPRANL	STK31	B*07
179	PRVRLLLL	PTH2	B*07
180	RLRDYISSL	RALGPS2	B*07/C*07
181	LPVSPARAL	ADAM12	B*07
182	RPLPVSPARAL	ADAM12	B*07
183	VPRRPARAL	BCAN	B*07

Seq ID No	Последовательность	Ген(ы)	Аллотип HLA
184	KIIASGNHL	ERVV-1, ERVV-2	B*07
185	RPVLTASSF	FCRL2	B*07
186	VPLPAGGGTVLT	GRP	B*07
187	APPPPPPPF	BEND4	B*07
188	HAAASFETL	FCRLA	B*07/B*35
189	QPQCSTHIL	APOB	B*07
190	RLAHVRARL	GREB1	B*07/C*07
191	KPKAVKPKAA	HIST1H1B	B*07
192	IPFADVVSF	ROS1	B*07
193	LPALKEEAF	NKX3-1	B*07/B*35
194	HPNLIKASL	TRPS1	B*07
195	NPIFGRKEL	CAPN6	B*07
196	RPSGTAGAAL	EGFR	B*07
197	RPSGTAGAALLA	EGFR	B*07/B*56
198	LPSPAHAFRAL	SIGLEC15	B*07
199	SPFWIHQA	MPL	B*07
200	EPFHLIVSY	FCRLA	B*07/B*35
201	LPIARVLTV	LRP1B	B*07/B*51
202	SPSREASAL	MPL	B*07
203	KPRGPIDI	COL9A1	B*07
204	FPYSGDKILV	VCAN	B*07/B*51
205	LPPALLTTV	VCAN	B*07/B*51
206	TPRIGPKVSL	VCAN	B*07
207	VPSDITTA	VCAN	B*07/B*35
208	RNRQVATAL	SUCNR1	B*07
209	KIEQIRAVL	LAMB3	B*07
210	IPENRVVSY	CCL24	B*07/B*35
211	IPDTIASVL	SLC24A5	B*07
212	VPYAAQAAL	SP5	B*07
213	RPYQDAPVA	SIGLEC8	B*07/B*55
214	LPLKFFPII	TMPRSS3	B*07
215	IPVAIKEL	EGFR	B*07
216	LPWEQNEQV	APOB	B*07/B*51
217	SPGDKRLAAYL	APOB	B*07
218	VQRTPPPI	USH1C	B*07
219	VPHTGRYTCL	HMCN1	B*07
220	RPAPGPAPFV	GRIN2D	B*07
221	LPQRPNARL	LAMB3	B*07
222	MLKTTLTAF	APOB	B*07

Seq ID No	Последовательность	Ген(ы)	Аллотип HLA
223	KAHVRIEL	RNF43, SUPT4H1	B*07/C*16
224	SPIIHSILL	PLEKHG4B	B*07
225	SPIIHSIL	PLEKHG4B	B*07
226	APGGSSRSSL	IGLL1	B*07
227	RPGTGQGGL	IGLL1	B*07
228	RPTAASQSRAL	IGLL1	B*07
229	FPNAGPRHLL	RALGPS2	B*07
230	DVIDDIISL	MITF	B*07/A*25
231	SPITLQAL	APOB	B*07
232	TAYPSLRLL	ST8SIA2	B*07/C*06
233	MAYDRFIAI	OR10V1, OR4K1, OR51B2, OR51B5, OR9K2	B*07/C*03
234	HPRAPGEQQRL	RNF43, SUPT4H1	B*07
235	AQNPAGTAL	HMCN1	B*07/B*15
236	TPELKSSIL	APOB	B*07
237	LPRAGGAF	LAMB3	B*07
238	LPRAGGAFLM	LAMB3	B*07
239	VLPRAGGAFLM	LAMB3	B*07
240	RVMLPKAAL	NLRP2	B*07
241	LPKAALLV	NLRP2	B*07/B*51
242	IPETASVVAI	FCRLA	B*07
243	MARTGGMVVI	UPK2	B*07
244	VPAHLVAA	ESM1	B*07/B*55
245	GPVPSPLAL	GDF7	B*07
246	RPILKEQSSSSF	KRT13, KRT16	B*07
247	SPVGVGQRL	SOX3	B*07
248	KPYDGIPAS	EGFR	B*07/B*56
249	SPRSGVLL	LGR5	B*07
250	APAAPAAVPS	FEZF1	B*07
251	MPVDSFNSM	NFE2L3	B*07/C*04
252	QPENSLEGISL	NFE2L3	B*07
253	MPVDSFNSML	NFE2L3	B*07
254	RVIQGTTL	PHEX	B*07/A*32
255	VPSHWMVAL	CD79B	B*07
256	SPVPSHWMVAL	CD79B	B*07
257	APYGTLRKS	SYT12	B*07
258	SVIGPNSRL	BTLA	B*07/A*26
259	VPMPGVQAV	TMEM211	B*07
260	LVQSSRSEV	KRT16	B*07

Seq ID No	Последовательность	Ген(ы)	Аллотип HLA
261	SPSTSRTPPL	EGFR	B*07
262	SPSTSRTPLLSSL	EGFR	B*07
263	SQRPPATSQA	HTR3A	B*07
264	APRPGNWIL	LAMA1	B*07
265	FPRKPYEGRV	LOXL3	B*07
266	KPYEGRVEI	LOXL3	B*07
267	MPVPGILL	PMEL	B*07
268	EPLSVTASY		B*07/A*25
269	FTVSSSSAM	LOC100131514, LOC101060622, MUC3A	B*07/C*03
270	SPRGTTSTL		B*07
271	SPTPVFTTL	LOC100131514, LOC101060622, LOC101060740, LOC101060797, MUC3A, MUC3B	B*07
272	SSPRGTTSTL		B*07
273	TDTPSTTPTTI	MUC3A	B*07
274	KPIRTGISPLAL	APOB	B*07
275	IPAPQGAVL	KISS1	B*07
276	RPVWDVRSA	RNASE10	B*07/B*55
277	MPPLLIVAF	HCAR1	B*07/B*35
278	LIAARGSLVL	NTN3	B*07
279	APADEPRTVL	SAPCD2	B*07
280	LPRAFLQSL	SAPCD2	B*07
281	NPRSPPATM	SIGLEC15	B*07
282	AVRLPTPNL	MPL	B*07
283	RPQPGWRESL	FMR1NB	B*07
284	RPSAPRGPP	ASCL2	B*07
285	RITWKGLLL	PSG3, PSG8, PSG9	B*07/C*07
286	APARPAAAF	TDRD9	B*07
287	SPIPRPLFL	SYCP2	B*07
288	LHAMNSLSAM	DMBX1	B*07
289	LPYEKVSRL	CHST4	B*07
290	RPTHPLRSF	DCC	B*07
291	SPSKSLEM	L1TD1	B*07
292	LPMTHRLQL	PSG4, PSG5, PSG6, PSG7	B*07
293	FPYDKPLIM	MET	B*07/B*51

Seq ID No	Последовательность	Ген(ы)	Аллотип HLA
294	VPKPAIPSSSVL	DCC	B*07
295	HPRWIEPTVM	HOXA13	B*07
296	SPLLMQRTL	TFEC	B*07/B*51
297	FPIKYVNDF	MET	B*07/B*35
298	RVLLRWISL	ILDR2	B*07
299	SPFSGGPVSF	POU5F1, POU5F1B	B*07
300	HPYSDLADV	RTL1	B*07
301	FPAFLEAM	RTL1	B*07/B*35
302	IPIDQILNSF	RTL1	B*07/B*35
303	RPPPPCIAL	RTL1	B*07
304	SPLIGDFPAF	RTL1	B*07/B*35
305	AASPVGSAL	SLC16A11	B*07/C*03
306	RPFPLALL	CYP2W1	B*07
307	RPHQKGWLSI	KLB	B*07
308	RPDVVRTLL	ARSI	B*07
309	FAFYGGKSL	SLC44A5	B*07/C*03
310	SPGWAQTQL	MACC1	B*07
311	APRLALDPDAL	AMH	B*07
312	SPSLQSSRESL	KIF26B	B*07
313	VPLSSYVSI	PCDHGA11	B*07
314	IAlMKLAGPL	TMPRSS3	B*07
315	APVVPAL	GSC	B*07
316	NPREPEKSL	LOC100124692	B*07
317	MPYNSAHHCVV	KLHL14	B*07/B*51
318	TPISNTGVL	SIGLEC6	B*07
319	RPLDTFRVL	EVX1	B*07
320	APMHIDRNIL	SLC10A5	B*07
321	QPQQPGFFL	MED12L	B*07
322	RAVPVGSGL	TRIT1	B*07/C*03
323	TPHGITDIL	NKX6-3	B*07
324	LPAPLRISL	GPR45	B*07
325	SPRSNPVRL	FCRL4	B*07
326	IPPFTQRVF	RASSF9	B*07/B*35
327	GPRTTQSSVL	SIGLEC6	B*07
328	LPLHRGDLVI	DNMBP	B*07/B*51
329	QPANFIVLL	LOC100124692	B*07
330	RPFSAIAEL	MORC4	B*07
331	SPDSAILKL	ZNF827	B*07
332	SPYAGSTAF	IRX5	B*07

Seq ID No	Последовательность	Ген(ы)	Аллотип HLA
333	SVLPRALSL	C5orf34	B*07/C*07
334	YPLSLALHF	C5orf34	B*07/B*35
335	VPPQNPRLSL	RUNX2	B*07
336	YPLQGPGLLSV	NUP155	B*07/B*51
337	IPTSRVITL	NUGGC	B*07
338	MPATPSLKV	TRIM15	B*07
339	GPQRTTSV	DTX1	B*07
340	APEPRAALL	UAP1L1	B*07
341	LPRSPPLKVL	RMI2	B*07
342	RPRPPKVL	TXNRD1	B*07
343	RPRPPKVLGL	TXNRD1	B*07
344	VPYPSPTCV	AR	B*07
345	SAAPPGASL	AR	B*07/C*03
346	IPMPRITWL	FSTL4	B*07
347	SPLEKINSF	BRIP1	B*07
348	HPAPPVTSA	STON2	B*07/B*54
349	QPRDGWPMML	STON2	B*07
350	RPKSTLMNF	STON2	B*07
351	SPYADIIPSA	GLI3	B*07/B*54
352	LPAFSKIGGIL	IQGAP3	B*07
353	KPRATWTL	RTP4	B*07
354	APAKDARASL	TRIO	B*07
355	APKTSFIAA	GALNT5	B*07/B*55
356	RPFLRLPSL	UCHL3	B*07
357	LPPHIFAI	MYO10	B*07/B*51

Таблица 1б: Пептиды в соответствии с настоящим изобретением.

Seq ID No.	Последовательность	Ген(-ы)
448	TVYGEPRKL	MAGEA4
449	RPKTSVNLISL	MMP12
450	SAAARALLP	MMP11
451	VPILPLNHAL	PGR
452	QPVKKNTL	ENPP3
453	APALPGQVTI	MEX3A
454	SPDPAHLESL	MAGEA8
455	FPVQATIDF	DSCR6
456	VPVSHVLTLL	FCRL5
457	RPPLSQRHTF	CLNK

Seq ID No.	Последовательность	Ген(-ы)
458	VPIPTHYFVVL	ENPP3,OR2A4
459	SPAPWRPWI	DSCR6
460	APLMPLGKTL	LAMC2
461	MPHLGPGILL	ITIH6
462	MPLLADVRL	ITIH6
463	LPTDLFNSVM	ROPN1,ROPN1B
464	VPFVPRTSV	NFE2L3
465	VPKSLPYVL	GTSF1
466	SPMEAILVSRL	MAP7D2
467	VPRNQDWLGVSRQL	PMEL
468	LPSLHVLVL	DCT
469	LPLDTRTSI	CLNK
470	RPNGEVKSEL	GRM8
471	LPLLAGTLLL	ALPI,ALPP,ALPPL2
472	LPMPAITWY	HMCN1
473	LPGEREAAL	FMN1,LOC101059984
474	VPKADLLTL	FMN1,LOC101059984
475	IPLEIQKL	CDRT1,FBXW10
476	EPNPVEEIF	COL11A1
477	NPVPVITWYKDNRL	HMCN1
478	APKFISPASQL	GRM8
479	APHAGGALL	MIXL1
480	VPAAPTKAL	SPOCD1
481	SPARALLLALA	ADAM12
482	QPSSLKKIIL	INSL4
483	KPAAAGVKKVA	HIST1H1B
484	LPASAEPKGTM	OFCC1
485	LPLKTKVFA	ZPLD1
486	TPTRPLPSA	USH1C
487	IPWFIKTAF	SLC24A5
488	LPLGGLPLLI	BTLA
489	WPNHIMLVL	GREB1,GREB1L
490	APRGPAQGEAA	RUNX1
491	MPEADLKRIF	SLC24A5
492	IPFSVDEI	NFE2L3
493	LPLQQYKLV	FEZF1
494	LPLRAVNLNL	FAM64A
495	SPSYTQASL	TRPS1
496	MPAVSGPGPLF	LMAN1L

Seq ID No.	Последовательность	Ген(-ы)
497	YVVKPLHPF	ROS1

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

SEQ ID No.	Последовательность	Официальный(ые) символ(ы) гена
358	APSMRLRKNQL	DCAF4L2
359	SPRRLVELAGQSL	PRAME
360	SPASRSISLL	CD70
361	SPYGSDRLVQL	ZBTB32
362	KPMLPPAAF	MSX1
363	KPRTPFHTA	MSX1
364	KPRTPFHTAQL	MSX1
365	RPKHFLQML	NLRP7
366	SPTLRQLDL	NLRP11
367	APQVHIFSL	OXTR
368	NPASRLTAL	BMPR1A, BMPR1B
369	RPYGCVLRAA	CD70
370	AAHEFGHVL	MMP11
371	APRSPGQVTPRGL	C6orf223
372	SPSSASLTL	FAM227B
373	LPKPDLPQLI	DEFB132
374	KPRNMTGLDL	CLEC17A
375	LPRGVLEGL	SAPCD2
376	FPQVGRTAL	CXCR3
377	SPFSKRIKL	BCL11A
378	SPRQPRLDF	E2F7
379	GPRQVLFPL	PCDHGB6, PCDHGB7
380	SPYPGSAAF	IRX2
381	APRPRLLLL	TGFBR1
382	RPGPQRTTSV	DTX1
383	KPRATWTLKL	RTP4

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

Seq ID No	Последовательность	Ген(-ы)
498	RPQPQPRPAL	WNT10A
499	QVLPSPAC	PMEL

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

SEQ No.	ID	Последовательность	Официальный(ые) символ(ы) гена
384		APLLLARAA	ACPP
385		FPSLREAAL	MAGEA1
386		YPLRGSSI	ALPP, ALPPL2
387		MPMQDIKM	PRAME
388		SPSVSQLSVL	PRAME
389		APLPRPGAVL	CTAG2
390		SPRMSGLLSQT	DLL3
391		APRPASSL	MMP11
392		GPQPWHAAL	MMP11
393		APAAWLRSA	MMP11
394		APAAWLRSAA	MMP11
395		APAAWLRSAAA	MMP11
396		VPDVAQFVL	MMP1
397		GPALGRSFL	CD70
398		SPASRSISL	CD70
399		NPFYPEVEL	MMP1
400		TIASQRLTPL	CD70
401		RPAPADSAL	KISS1R
402		LPSPVDAAF	MMP11
403		RGVPSEIDAAF	MMP11
404		VPSEIDAAF	MMP11
405		LPFDGPGGIL	MMP11
406		LPDGSRVEL	ACTL8
407		FPRLVGPDP	MMP11
408		YPKDIYSSF	MMP1
409		IPASHPVL	FCRL5
410		SPRSWIQVQI	FCRL5
411		IPNWARQDL	NLRP7
412		HPSAHDVIL	LAMC2
413		SVHKITSTF	LAMC2
414		KPSESIYSAL	FAM111B
415		LPSDSHFKITF	FAM111B
416		RAKNAGVTI	LAMC2
417		VPRPIFSQL	GREB1, GREB1L
418		RPMTPTQIGPSL	TCL1A
419		SPMWHVQQL	QRFPR
420		SPRWLPVSL	BTBD17
421		FPTEVTPHAF	PTPRZ1
422		IPVSHPVL	FCRL3
423		SPRVYWLGL	CLEC17A

SEQ No.	ID	Последовательность	Официальный(ые) символ(ы) гена
424		YPRGNHWAVGH	GRP
425		YPRGNHWAVGHL	GRP
426		RYLPNPSLNAF	CYP1A1
427		VPSSRILQL	THEG
428		SPADHRNL	NLRP2
429		RPRALRDLQL	NLRP7
430		RPRALRDLQLL	NLRP7
431		VPLPAGGGTV	GRP
432		VPLPAGGGTVL	GRP
433		IPEPSAQQ	APOB
434		LPRIPFADV	ROS1
435		MPLSTIREV	CDK6
436		RPMQQARAQL	KLHDC7B
437		FPYPYAERL	GRIN2D
438		LPRAGGAFL	LAMB3
439		NPFPHLITL	ROS1
440		YPRITPGM	KLK14
441		SPVPSHWMVA	CD79B
442		SPSTSRTPLL	EGFR
443		VPDGVSKVL	APOB
444		RVEEVRALL	CDKN2A
445		RPAATAVISL	SLC7A11

Настоящее изобретение, кроме того, относится в общем к пептидам в соответствии с настоящим изобретением для применения при лечении пролиферативных заболеваний, таких как, например, острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, рака мочевого пузыря, рака матки и эндометрия.

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: 383 и с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 499. Более предпочтительными являются пептиды – в отдельности или в комбинации – выбранные из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 79 (см. Таблицу 1а), и их применение в иммунотерапии рака и предпочтительно острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия.

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

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: 383 и с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 499.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Настоящее изобретение далее относится к способу в соответствии с настоящим изобретением, где антигенпрезентирующая клетка включает вектор экспрессии, способный экспрессировать или экспрессирующий указанный пептид, содержащий последовательности с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 383 и с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 499, предпочтительно содержащий последовательность с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 79 или вариантную аминокислотную последовательность.

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

В одном аспекте активированные Т-лимфоциты могут быть получены с помощью контактирования Т-клеток *in vitro* с нагруженными антигеном молекулами МНС человека I или II класса, презентированными на поверхности подходящей антигенпрезентирующей клетки или искусственной конструкции, имитирующей антигенпрезентирующую клетку, на период времени, достаточного для активации указанных Т-клеток.

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

Настоящее изобретение далее относится к способу лечения пациента, больного раком, раковые клетки которого аберрантно экспрессируют полипептид, включающий любую аминокислотную последовательность в соответствии с

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

Настоящее изобретение далее относится к способу вызывания иммунного ответа у пациента, больного раком, раковые клетки которого аберрантно экспрессируют полипептид, включающий любую аминокислотную последовательность в соответствии с настоящим изобретением, причем способ включает введение пациенту эффективного числа Т-клеток, полученных в соответствии с настоящим изобретением.

В одном аспекте иммунный аспект может включать ответ цитотоксических Т-клеток.

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

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

Настоящее изобретение относится далее к применению в соответствии с настоящим изобретением, где указанные раковые клетки являются клетками острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы,

рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия, и предпочтительно клетки острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия.

Настоящее изобретение далее относится к биомаркерам на основе пептидов в соответствии с настоящим изобретением, в настоящем документе называемым «мишенями», которые могут быть использованы при постановке диагноза рака, предпочтительно острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия. 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

срезом опухоли для выявления присутствия интересующего пептида в комплексе с МНС может использоваться антитело или растворимый ТКР.

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

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

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

Специфические элементы клеточных иммунных ответов способны к специфическому распознаванию и уничтожению опухолевых клеток. Выделение Т-клеток из популяций опухоль-инфильтрирующих клеток или из периферической крови предполагает, что такие клетки играют значительную 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 значительную роль в этом ответе. Эти пептиды обычно состоят из 8-10 аминокислотных остатков, полученных из белков или дефектных рибосомных продуктов (DRIP), находящихся в цитозоле. Молекулы МНС человека называются также человеческими лейкоцитарными антигенами (HLA).

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

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

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

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

Понятие «пептид» включает также понятие «олигопептид». Понятие «олигопептид» в контексте настоящего описания обозначает серии аминокислотных остатков, связанных друг с другом обычно пептидными связями между альфа-аминными и карбонильными группами смежных аминокислот. Длина олигопептида не особенно

важна для изобретения до тех пор, пока в нем сохраняются надлежащие эпитопы или эпитопы. Олигопептиды обычно бывают менее чем около 30 аминокислотных остатков в длину и более чем около 15 аминокислот в длину.

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

Пептид, олигопептид, белок или полинуклеотид, кодирующий такую молекулу, является «иммуногенным» (и, таким образом, «иммуногеном» в рамках настоящего изобретения), если он способен индуцировать иммунный ответ. В случае настоящего изобретения иммуногенность получает более специфическое определение как способность индуцировать Т-клеточный ответ. Таким образом, «иммуноген» будет представлять собой молекулу, которая способна индуцировать иммунный ответ, и, в случае настоящего изобретения, молекулу, способную индуцировать Т-клеточный ответ. В другом аспекте иммуноген может быть пептидом, комплексом пептида и МНС, олигопептидом и/или белком, используемым для получения специфических антител или ТКР против него.

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

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

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

Аллель	Популяция	Рассчитанный фенотип по частоте аллеля (F)
A*02	Афроамериканцы (N=28557)	32,3%
	Белые европейцы (N=1242890)	49,3%
	Японцы (N=24582)	42,7%
	Латиноамериканцы, Юж. + Центр. Амер. (N=146714)	46,1%
	Юго-восточные азиаты (N=27978)	30,4%
A*01	Афроамериканцы (N=28557)	10,2%
	Белые европейцы (N=1242890)	30,2%
	Японцы (N=24582)	1,8%
	Латиноамериканцы, Юж. + Центр. Амер. (N=146714)	14,0%
	Юго-восточные азиаты (N=27978)	21,0%
A*03	Афроамериканцы (N=28557)	14,8%
	Белые европейцы (N=1242890)	26,4%
	Японцы (N=24582)	1,8%
	Латиноамериканцы, Юж. + Центр. Амер. (N=146714)	14,4%

Аллель	Популяция	Рассчитанный фенотип по частоте аллеля (F)
	Юго-восточные азиаты (N=27978)	10,6%
A*24	Афроамериканцы (N=28557)	2,0%
	Белые европейцы (N=1242890)	8,6%
	Японцы (N=24582)	35,5%
	Латиноамериканцы, Юж. + Центр. Амер. (N=146714)	13,6%
	Юго-восточные азиаты (N=27978)	16,9%
B*07	Афроамериканцы (N=28557)	14,7%
	Белые европейцы (N=1242890)	25,0%
	Японцы (N=24582)	11,4%
	Латиноамериканцы, Юж. + Центр. Амер. (N=146714)	12,2%
	Юго-восточные азиаты (N=27978)	10,4%
B*08	Афроамериканцы (N=28557)	6,0%
	Белые европейцы (N=1242890)	21,6%
	Японцы (N=24582)	1,0%
	Латиноамериканцы, Юж. + Центр. Амер. (N=146714)	7,6%
	Юго-восточные азиаты (N=27978)	6,2%
B*44	Афроамериканцы (N=28557)	10,6%
	Белые европейцы (N=1242890)	26,9%
	Японцы (N=24582)	13,0%
	Латиноамериканцы, Юж. + Центр. Амер. (N=146714)	18,2%
	Юго-восточные азиаты (N=27978)	13,1%

Пептиды по изобретению, предпочтительно когда они включены в состав вакцины по изобретению согласно описанию в настоящем документе, связываются с В*07. Вакцина также может включать универсальные пептиды, связывающиеся с МНС II класса. Поэтому вакцина по изобретению может применяться для лечения рака у пациентов, которые являются В*07-положительными, причем в связи с

универсальной по связыванию природе данных пептидов не нужен подбор аллотипов МНС II класса.

Если пептиды В*07 по изобретению скомбинировать с пептидами, связывающимися с другим аллелем, например А*24, лечение может пройти более высокий процент любой популяции пациентов по сравнению с охватом каждого аллеля МНС I класса в отдельности. Тогда как в большинстве популяций любым одним аллелем могут быть охвачены менее чем 50% пациентов, вакциной, включающей эпитопы HLA-A*24 и HLA-A*02 можно лечить не менее 60% пациентов любой соответствующей популяции. Говоря конкретно, следующие процентные доли пациентов будут положительными по меньшей мере для одного из этих аллелей в различных регионах: США – 61%, Западная Европа – 62%, Китай – 75%, Южная Корея – 77%, Япония – 86% (рассчитано по данным www.allelefrequencies.net).

Таблица 5: Охват HLA-аллелем популяции европеоидной расы (рассчитано в соответствии с (Grager et al., 2013)).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

предпочтительно, 99,999% или по меньшей мере 99,99% или 99,9%; и даже желательно 99% по массе или более.

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

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

отношению к полинуклеотидам эти понятия относятся к продуктам, полученным при обработке указанных полинуклеотидов любой из эндонуклеаз.

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

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

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

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

(ii) каждая брешь в Контрольной последовательности и

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

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

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

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

Как было упомянуто выше, в настоящем изобретении, таким образом, предложен пептид, включающий последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 383 и с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 499 или ее вариант, который на 88% гомологичен последовательностям с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 383 и с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 499, или их варианту, который индуцирует перекрестную реакцию Т-клеток с указанным пептидом. Пептиды по изобретению обладают способностью связываться с молекулой главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) I класса или – удлиненные версии упомянутых пептидов – с МНС II класса.

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

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

Под «вариантом» данной аминокислотной последовательности авторы изобретения имеют в виду, что боковые цепи, например, одного или двух аминокислотных остатков, изменены (например, путем их замещения боковой цепью остатка другой встречающейся в природе аминокислоты или какой-либо другой боковой цепью) так, что пептид по-прежнему способен связываться с молекулой HLA по существу таким же путем, как и пептид, состоящий из данной аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 383 и с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 499. Например, пептид может быть модифицирован таким образом, что он по меньшей мере сохранит, если не улучшит, способность взаимодействовать и связываться со связывающей бороздкой подходящей молекулы MHC, такой как HLA-A*02 или -DR, и, таким образом, он по меньшей мере сохранит, если не улучшит, способность связываться с ТКР активированных Т-клеток.

Данные Т-клетки могут затем вступать в перекрестную реакцию с клетками и уничтожать клетки, которые экспрессируют полипептид, который содержит природную аминокислотную последовательность родственного пептида, как определено в аспектах этого изобретения. По информации из научной литературы и банков данных (Godkin et al., 1997; Rammensee et al., 1999), 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: 383 и с SEQ ID NO: 448 по SEQ

ID NO: 499, 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 обмены внутри одной из последующих пяти групп: группа 1 – малые, алифатические, неполярные или слабо полярные остатки (Ala, Ser, Thr, Pro, Gly); группа 2 – полярные, отрицательно заряженные остатки и их амиды (Asp, Asn, Glu, Gln); группа 3 – полярные, положительно заряженные остатки (His, Arg, Lys); группа 4 – крупные, алифатические, неполярные остатки (Met, Leu, Ile, Val, Cys); и группа 5 – крупные, ароматические остатки (Phe, Tyr, Trp).

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

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

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

Таблица А.

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

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

Таблица Б.

Аминокислотные замены

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

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

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

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

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

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

Наиболее предпочтительными являются пептиды, состоящие из представленных последовательностей.

Таблица 6. Варианты и мотив пептидов в соответствии с SEQ ID NO: 13, 25, 38, 54 и 362

Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Seq ID No 13	L	P	N	T	G	R	I	G	Q	L	
Вариант										F	
										V	
										M	
										A	
										I	
Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
Seq ID No 25	R	P	Q	G	A	V	G	G	L		
Вариант									F		
									V		
									M		
									A		
									I		

Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Seq ID No 38	R	P	S	F	P	N	L	T	S	F	
Вариант										L	
										V	
										M	
										A	
										I	
Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Seq ID No 54	V	P	S	C	G	R	S	V	E	G	L
Вариант											F
											V
											M
											A
											I
Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
Seq ID No 362	K	P	M	L	P	P	A	A	F		
Вариант									L		
									V		
									M		
									A		
									I		

Более длинные (удлиненные) пептиды также могут быть пригодными. Возможно, чтобы эпитопы, связывающиеся с молекулами МНС I класса, хотя они обычно имеют длину между 8 и 11 аминокислотами, были получены при процессинге пептидов из более длинных пептидов или белков, включающих истинный эпитоп. Предпочтительно, чтобы остатки, которые примыкают к истинному эпитопу,

существенно не влияли на протеолитическое расщепление, необходимое для презентации истинного эпитопа во время процессинга.

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

Таблица 7: Комбинации элонгаций пептидов по изобретению

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

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

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

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

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

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

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

В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения пептид состоит или по существу состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 383 и с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 499.

«Состоит по существу из» подразумевает, что пептид в соответствии с настоящим изобретением, помимо любой из последовательностей в соответствии с любой из SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 383 и с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 499 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 антиген-ассоциированной инвариантной цепи (р33, в дальнейшем «I») HLA-DR, как взятый из банка данных NCBI, инвентарный номер - GenBank Accession-number X00497. В других видах слияния пептиды по настоящему изобретению могут быть слиты с антителом, описанным в настоящем документе, или его функциональной частью, в частности встроены в последовательность антитела, так чтобы быть специфической мишенью указанного антитела, или, например, слиты с или встроены в антитело, являющееся специфичным для дендритных клеток, описанных в настоящей заявке.

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

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

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

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

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

Подобным образом, пептид или вариант по изобретению может быть модифицирован химическим способом посредством реакции отдельных аминокислот как до, так и после синтеза пептида. Примеры таких модификаций хорошо известны из уровня техники и обобщаются, например, в работе R. Lundblad, *Chemical Reagents for Protein Modification*, 3rd ed. KPK Press, 2004 (Lundblad, 2004), которая включена в описание по ссылке. Химическая модификация аминокислот включает, но без ограничения, модификацию с помощью ацилирования, амидинирования, пиридоксилерования лизина, восстановительного алкилирования, тринитробензилирования аминных групп 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислотой (TNBS), амидную модификацию карбоксильных групп и сульфгидрильную модификацию с помощью окисления надмуравьиной кислотой цистеина до цистеиновой кислоты, образование производных ртути, образование смешанных дисульфидов с другими тиоловыми соединениями, реакцию с малеимидом, карбоксиметилирование йодоуксусной кислотой или йодацетамидом и карбамоилирование цианатом при щелочном уровне pH, хотя не ограничиваясь ими. В этой связи специалист данной области может проконсультироваться с главой 15 в работе *Current Protocols In Protein Science*, Eds. Hassan и соавт. (John Wiley and Sons NY 1995-2000) (Coligan et al., 1995) для получения более обширной информации о методах, связанных с химической модификацией белков.

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

Распространено также избирательное восстановление дисульфидных связей в белках. Дисульфидные связи могут быть образованы и окислены во время тепловой обработки биофармацевтических средств. К-реагент Вудворда может использоваться для модификации определенных остатков глутаминовой кислоты. N-(3-(диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимид может использоваться для образования внутримолекулярных поперечных связей между остатком лизина и остатком глутаминовой кислоты. Например, диэтилпирокарбонат является реагентом для модификации гистидильных остатков в белках. Гистидин может также быть модифицирован при использовании 4-гидрокси-2-ноненаля. Реакция остатков лизина и других α -аминных групп полезна, например, при связывании пептидов с поверхностями или поперечной сшивке белков/пептидов. Лизин является сайтом присоединения полиэтиленгликоля и основным сайтом модификации при гликозилировании белков. Остатки метионина в белках могут быть модифицированы, например, с помощью йодацетамида, бромэтиламина и хлорамина T.

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

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

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

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

Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к не встречающемуся в природе пептиду, где указанный пептид состоит или состоит по существу из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 383 и с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 499 и был получен синтетическим способом (например, синтезирован) в виде фармацевтически приемлемой соли. Способы синтетического получения пептидов хорошо известны в данной области. Соли пептидов в соответствии с настоящим изобретением существенно отличаются от пептидов по своему состоянию(ям) *in vivo*, так как синтезированные пептиды не являются солями *in vivo*. Не встречающаяся в природе солевая форма пептида опосредует растворимость пептида, в частности, в контексте фармацевтических композиций, включающих пептиды, например вакцин на основе пептидов, раскрытых в настоящем описании. Достаточная и по меньшей мере существенная растворимость пептида(ов) необходима для эффективного введения пептидов субъекту, подлежащему лечению. Предпочтительно, если соли являются фармацевтически приемлемыми солями пептидов. Соли в соответствии с изобретением включают щелочные и щелочноземельные соли, такие как соли рядов Гофмейстера, включающие в

качестве анионов PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , CH_3COO^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , ClO_4^- , I^- , SCN^- и в качестве катионов NH_4^+ , Rb^+ , K^+ , Na^+ , Cs^+ , Li^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} и Ba^{2+} . В частности, соли выбраны из $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, NH_4Cl , NH_4Br , NH_4NO_3 , NH_4ClO_4 , NH_4I , NH_4SCN , Rb_3PO_4 , Rb_2HPO_4 , RbH_2PO_4 , Rb_2SO_4 , $\text{Rb}_4\text{CH}_3\text{COO}$, Rb_4Cl , Rb_4Br , Rb_4NO_3 , Rb_4ClO_4 , Rb_4I , Rb_4SCN , K_3PO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , K_2SO_4 , KCH_3COO , KCl , KBr , KNO_3 , KClO_4 , KI , KSCN , Na_3PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , Na_2SO_4 , NaCH_3COO , NaCl , NaBr , NaNO_3 , NaClO_4 , NaI , NaSCN , ZnCl_2 , Cs_3PO_4 , Cs_2HPO_4 , CsH_2PO_4 , Cs_2SO_4 , CsCH_3COO , CsCl , CsBr , CsNO_3 , CsClO_4 , CsI , CsSCN , Li_3PO_4 , Li_2HPO_4 , LiH_2PO_4 , Li_2SO_4 , LiCH_3COO , LiCl , LiBr , LiNO_3 , LiClO_4 , LiI , LiSCN , Cu_2SO_4 , $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$, Mg_2HPO_4 , $\text{Mg}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, Mg_2SO_4 , $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, MgCl_2 , MgBr_2 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$, MgI_2 , $\text{Mg}(\text{SCN})_2$, MnCl_2 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, Ca_2HPO_4 , $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, CaSO_4 , $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, CaCl_2 , CaBr_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$, CaI_2 , $\text{Ca}(\text{SCN})_2$, $\text{Ba}_3(\text{PO}_4)_2$, Ba_2HPO_4 , $\text{Ba}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, BaSO_4 , $\text{Ba}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, BaCl_2 , BaBr_2 , $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$, BaI_2 и $\text{Ba}(\text{SCN})_2$. Особенно предпочтительными являются ацетат NH_4 , MgCl_2 , KH_2PO_4 , Na_2SO_4 , KCl , NaCl и CaCl_2 , такие как например, хлоридные или ацетатные (трифторацетатные) соли.

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

В одном аспекте полипептид, описываемый в настоящем контексте, представлен в форме фармацевтически приемлемой соли.

В другом аспекте полипептид представлен в форме фармацевтической соли в кристаллической форме.

В одном аспекте фармацевтически приемлемая соль, описываемая в настоящем контексте, относится к солям, имеющим профили токсичности в диапазоне, который приемлем для фармацевтического применения.

В одном аспекте фармацевтически приемлемые соли могут повышать растворимость и/или стабильность пептидов, описываемых в настоящем контексте. В другом аспекте фармацевтические соли, описываемые в настоящем контексте,

могут быть получены обычными средствами из соответствующего пептида-носителя или комплекса с помощью реакции, например, подходящей кислоты или основания с пептидами или комплексами, описываемыми в настоящем контексте.

В другом аспекте фармацевтически приемлемые соли представлены в кристаллической или полукристаллической форме.

В еще в одном аспекте фармацевтически приемлемые соли могут включать, например, те соли, что описаны в работе Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use авторов P. H. Stahl и C. G. Wermuth (Wiley-VCH 2002) и L. D. Bighley, S. M. Berge, D. C. Monkhouse, в Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Под ред. J. Swarbrick and J. C. Boylan, Vol. 13, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong 1995, pp. 453-499, каждая из этих ссылок включена в настоящую заявку ссылкой в ее полном объеме.

Как правило, пептиды и варианты (по меньшей мере те, что содержат пептидные связи между аминокислотными остатками) могут быть синтезированы Fmoc-полиамидным способом твердофазного синтеза пептидов, как раскрыто у Lukas и соавт. (Lukas et al., 1981) и в прилагающихся ссылках. Временная защита N-аминогруппы производится 9-флуоренилметилоксикарбонильной (Fmoc) группой. Повторное расщепление этой высоко щелочелабильной защитной группы осуществляется при использовании 20% пиперидина в N, N-диметилформамиде. Функциональные группы боковой цепи могут быть защищены получением таких соединений, как их бутиловые эфиры (в случае серина, треонина и тирозина), бутиловые сложные эфиры (в случае глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты), бутилоксикарбонильное производное (в случае лизина и гистидина), тритильное производное (в случае цистеина) и производное 4-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфонила (в случае аргинина). Если глютамин или аспарагин являются C-терминальными остатками, для защиты амидогруппы боковой цепи используется 4,4'-диметоксибензгидрильная группа. Твердофазный носитель основан на полимере полидиметилакриламиде, состоящем из трех мономеров: диметилакриламида (каркасный мономер), бис-акрилоилэтилендиамина

(компонент для перекрестной сшивки, линкер) и метилового эфира акрилоилсаркозина (функционализирующий агент). Для образования легкоотщепляемой связи пептида и смолы используется нестойкое к действию кислот производное 4-гидроксиметилфеноксисуксусной 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-гидроксibenзотриазолом. Все реакции сочетания и снятия защитных групп отслеживались с помощью методов контроля с применением нингидрина, тринитробензолсульфоновой кислоты или изотина. После завершения синтеза пептиды отщепляются от смолы-носителя с сопутствующим удалением защитных групп боковой цепи при обработке 95% трифторуксусной кислотой, содержащей 50 % смеси поглотителей. Обычно используемые поглотители включают этандитиол, фенол, анизол и воду, окончательный выбор зависит от составляющих аминокислот синтезируемого пептида. Также возможна комбинация твердофазных и жидкофазных методов синтеза пептидов (см., например, (Bruckdorfer et al., 2004), и прилагаемые ссылки).

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

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

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

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

Для идентификации и относительной количественной оценки лигандов HLA с помощью масс-спектрометрического анализа молекулы HLA из подвергнутых шоковой заморозке образцов тканей были очищены и из них выделены HLA-ассоциированные пептиды. Выделенные пептиды были разделены и последовательности были идентифицированы с помощью методов жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (LC-MS) с ионизацией электрораспылением (nanoESI) в режиме реального времени. Полученные в результате последовательности пептида подтверждали сравнением картины фрагментации природных опухолеассоциированных пептидов (TUMAP), записанной на образцах острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, рака гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы,

рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия (N = 149 образца), 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 первичной ткани раковой опухоли, полученной от 149 пациента с острым миелоидным лейкозом, раком молочной железы, холангиоцелочной карциномой, хроническим лимфоцитарным лейкозом, колоректальным раком, раком желчного пузыря, глиобластомой, раком желудка, гепатоклеточной карциномой, плоскоклеточной карциномой головы и шеи, меланомой, неходжкинской лимфомой, раком легких (в том числе немелкоклеточным раком легких-аденокарциномой, плоскоклеточным немелкоклеточным раком легких и мелкоклеточным раком легких), раком яичника, раком пищевода, раком поджелудочной железы, раком предстательной железы, почечно-клеточной карциномой, карциномой мочевого пузыря, раком матки и эндометрия.

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

идентификации последовательности, спектральной кластеризации, подсчета ионов, выравнивания времени удерживания, деконволюции по состояниям заряда и нормализации.

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

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

карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия.

Пептиды TUMAP, идентифицированные на многочисленных тканях острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия и на нормальных тканях, были подвергнуты количественному анализу с помощью ЖХ/МС без использования изотопной метки, с использованием подсчета ионов. Метод основан на предположении, что площади пика пептида при анализе методом ЖХ/МС коррелируют с его содержанием в образце. Все количественные сигналы пептида в различных экспериментах с использованием ЖХ/МС были нормализованы, исходя из основной тенденции, было вычислено их среднее значение на образец, и сведены в гистограмму в т. н. профиль презентации. В профиле презентации консолидированы различные методы анализа, такие как поиск в банке данных белков, спектральная кластеризация, деконволюция состояния заряда (разряд) и выравнивание времени удерживания и нормализация.

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

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

клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия человека.

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

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

лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия, презентирующие полученные пептиды.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ингредиентом, таким как радионуклид, химиотерапевтическим средством или токсином.

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

В одном варианте осуществления ТКР, содержащий по меньшей мере одну мутацию в альфа-цепи ТКР и/или бета-цепи ТКР, имеет аффинность связывания по отношению к и/или полупериод связывания по отношению к комплексу пептида и молекулы HLA, которые по меньшей мере вдвое выше, чем у ТКР, содержащего альфа-цепь ТКР без мутаций и/или бета-цепь ТКР без мутаций. Усиление аффинности опухолеспецифических ТКР, а также ее использование, опирается на существование «окна» с оптимальными показателями аффинности для ТКР. Существование такого окна основано на наблюдениях, что ТКР, специфические для HLA-B*07-рестриктированных патогенов, обладают показателями KD, которые, в основном, примерно в 10 раз ниже по сравнению с ТКР, специфическими для HLA-B*07-рестриктированных опухолеассоциированных аутоантигенов. Сейчас известно, хотя опухолевые антигены имеют иммуногенный потенциал, поскольку опухоли возникают из собственных клеток индивида, только мутантные белки или белки с изменениями в трансляционном процессинге будут восприниматься иммунной системой как чужеродные. Антигены, уровень которых повышен или которые экспрессируются в избытке (так называемые аутоантигены), не будут в обязательном порядке вызывать функциональный иммунный ответ против опухоли: Т-клетки, экспрессирующие ТКР, которые являются высоко активными по отношению к данным антигенам, будут подвергаться отрицательному отбору внутри вилочковой железы в процессе, известном как центральная толерантность, что означает, что останутся лишь Т-клетки с низкоаффинными ТКР к аутоантигенам. Поэтому аффинность ТКР или вариантов согласно настоящему

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

Настоящее описание относится далее к способу идентификации и выделения ТКР в соответствии с настоящим описанием, причем указанный способ включает инкубацию МКПК HLA-B*07-отрицательных здоровых доноров с B*07/пептидными мономерами, инкубацию МКПК с тетрамер-фикоэритрином (PE) и выделение Т-клеток с высокой авидностью с помощью сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS)–Calibur.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

доставки, например, липосомами. Пептид может быть также конъюгирован с подходящим носителем, таким как гемоцианин фиссуреллы (KLH) или маннан (см. WO 95/18145 и(Longenecker et al., 1993)). Пептид может быть также меченым или может быть слитым белком или гибридной молекулой. Пептиды, последовательность которых дана в настоящем изобретении, как ожидается, стимулируют CD4+ или CD8+ Т-клетки. Тем не менее, стимуляция CD8 Т-клеток более эффективна в присутствии поддержки, предоставляемой CD4 хелперными Т-клетками. Таким образом, для эпитопов 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: 383 и с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 499, 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, соединенные

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

противоположного определяющего комплементарность участка CDR, как описывается выше.

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

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

Об иммуностимулирующих олигонуклеотидах CpG также сообщалось, что они усиливают эффекты адъювантов в составе вакцин. Не желая быть связанными соответствием какой-либо конкретной теории, авторы полагают, что CpG-олигонуклеотиды при активации врожденной (не приобретенной) иммунной системы действуют с помощью Toll-подобных рецепторов (TLR), в основном, TLR9. Вызванная CpG активация TLR9 усиливает антиген-специфичные гуморальные и клеточные ответы на широкий спектр антигенов, включая пептидные или белковые антигены, живые или убитые вирусы, вакцины из дендритных клеток, аутологичные клеточные вакцины и полисахаридные конъюгаты как в профилактических, так и терапевтических вакцинах. Более важно то, что улучшается созревание и дифференциация дендритных клеток, приводя к повышенной активации клеток типа TH1 и интенсивной выработке цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) даже при отсутствии помощи со стороны CD4 Т-клеток. Активация TH1, вызванная стимуляцией TLR9, сохраняется даже в присутствии вакцинных адъювантов, таких как квасцы или неполный адъювант Фрейнда (IFA), которые обычно способствуют активации TH2. CpG-олигонуклеотиды проявляют даже бóльшую адъювантную активность, если они входят в состав или вводятся в организм вместе с другими адъювантами или в таких составах как микрочастицы, наночастицы, липидные эмульсии или в подобных составах, которые в особенности необходимы для инициации сильного ответа, если антиген относительно слаб. Они также ускоряют иммунную реакцию и позволяют снизить дозы антигена приблизительно на два порядка в сравнении с ответами антитела на полную дозу вакцины без CpG, что наблюдалось в некоторых экспериментах (Krieg, 2006). В патенте США № 6 406 705 B1 описывается комбинированное применение CpG-олигонуклеотидов, адъювантов, не включающих нуклеиновые кислоты, и антигена для вызывания антиген-специфического иммунного ответа. Антагонистом CpG TLR9 является dSLIM (иммуномодулятор со структурой типа двухцепочечный стебель-петля) компании Mologen (Берлин, Германия), который является предпочтительным

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

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

Предпочтительными адъювантами являются анти-CD40, имиквимод, резиквимод, ГМ-КСФ, циклофосфамид, сунитиниб, бевацизумаб, интерферон-альфа, интерферон-бета, CpG олигонуклеотиды и их производные, поли-(I:C) и ее производные, РНК, силденафил, составы из твердых микрочастиц с поли(лактид когликолиде (PLG), виросомы, атезолизумаб, интерлейкин (ИЛ)-1, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-7, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-15, ИЛ-21 и ИЛ-23.

В предпочтительном варианте осуществления фармацевтической композиции в соответствии с изобретением адъювант выбран из группы, состоящей из колониестимулирующих факторов, таких как гранулоцитарно-макрофагальный

колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ, сарграмостим), циклофосфамид, имиквимод, резиквимод и интерферон-альфа.

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

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

Важно понимать, что иммунный ответ, вызванный вакциной в соответствии с изобретением, направлен на раковые клетки на различных стадиях клеточного цикла и различных стадиях развития опухоли. Кроме того, атака направлена на

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

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

молекулы, аптамеры, (растворимые) ТКР и (модифицированные) клетки, такие как аллогенные или аутологичные Т-клетки. Чтобы оценить, является ли молекула каркасом, связывающимся с мишенью, может быть проведен анализ связывания.

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

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

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

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

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

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

Могут быть отобраны ДНК-аптамеры, проявляющие широкий спектр свойств по распознаванию различных раковых клеток, и, в частности, клеток, образованных из солидных опухолей, тогда как неопухолегенные и первичные здоровые клетки не распознаются. Если идентифицированные аптамеры распознают не только конкретный опухолевый подтип, но и взаимодействуют с различными опухолями,

это делает возможным применение аптамеров в качестве так называемых диагностических и терапевтических средств широкого спектра действия.

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

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

Могут быть отобраны аптамеры к сложным мишеням, таким как клетки и ткани и комплексы пептидов, включающих, предпочтительно состоящих из последовательности в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 383 и с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 499 в соответствии с представленным изобретением с молекулой МНС, используя метод cell-SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment - систематическая эволюция лигандов при экспоненциальном обогащении).

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

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

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

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

в целях настоящего изобретения в явном виде включены во всей полноте путем ссылки.

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

Настоящее изобретение относится к пептиду, включающему последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 383 и с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 499 или их вариант, который по меньшей мере на 88% гомологичен (предпочтительно, если он идентичен) последовательности с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 383 и с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 499, или их варианту, который индуцирует перекрестную реакцию Т-клеток с указанным пептидом, где указанный пептид не является базовым полипептидом полной длины.

Настоящее изобретение далее относится к пептиду, включающему последовательность, которая выбрана из группы с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 383 и с SEQ ID NO 448 по SEQ ID NO 499 или его варианту, который по меньшей мере на 88% гомологичен (предпочтительно, идентичен) последовательности с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 383 и с SEQ ID NO 448 по SEQ ID NO 499, 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: 383 и с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 499.

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

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

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

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

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

Настоящее изобретение далее относится к пептиду в соответствии с настоящим изобретением, к нуклеиновой кислоте в соответствии с настоящим изобретением или к вектору экспрессии в соответствии с настоящим изобретением для применения в медицине, в частности, в лечении острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи,

меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия.

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: 383 и с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 499 или указанный вариант аминокислотной последовательности.

Настоящее изобретение далее относится к активированным Т-клеткам, полученным способом в соответствии с настоящим изобретением, где указанные Т-клетки селективно распознают клетку, которая aberrantly 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 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 относится далее к применению в соответствии с изобретением, где указанные раковые клетки являются клетками острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы,

плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия или клетками других солидных или гематологических опухолей, таких как клетки острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия.

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

Понятие «антитело» или «антитела» используется в контексте данного изобретения в широком смысле и включает как поликлональные, так и моноклональные антитела. В дополнение к интактным или «полным» молекулам иммуноглобулина в понятие «антитела» включены также фрагменты (например, участки CDR, фрагменты Fv, Fab и Fc) или полимеры таких молекул иммуноглобулина и гуманизированные версии молекул иммуноглобулина, при условии, что они проявляют любое из желаемых свойств (например, специфически связываются с (поли)пептидным маркером острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия, доставляют токсин к клетке острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия, экспрессирующей раковый ген-маркер на повышенном уровне и/или ингибируют активность полипептида-маркера острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и

мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия) в соответствии с настоящим изобретением.

Если возможно, антитела по изобретению могут быть куплены в коммерческих источниках. Антитела по изобретению могут быть также получены при использовании хорошо известных способов. Опытному специалисту будет понятно, что для получения антител по изобретению могут использоваться как полипептидные маркеры острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоциточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия 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: 383 и с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 499, полипептид или вариант или его фрагмент может быть экспрессирована в прокариотических клетках (например, бактерий) или эукариотических клетках (например, клетках дрожжей, насекомых или млекопитающих), после чего рекомбинантный белок может быть очищен и использован в получении препарата моноклональных или поликлональных антител, которые специфически связываются с полипептидным маркером острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоциточной карциномы,

хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия, использованным для получения антитела по изобретению.

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

Понятие «моноклональное антитело» в контексте настоящего изобретения обозначает антитело, полученное из, по существу, гомогенной популяции антител, т. е. отдельные антитела внутри популяции идентичны за исключением возможных естественных мутаций, которые могут быть представлены в небольших количествах. Моноклональные антитела в контексте настоящего изобретения

специфически включают «химерные» антитела, в которых участок тяжелой и/или легкой цепи идентичен или гомологичен соответствующим последовательностям антител, полученных из конкретного вида или относящихся к конкретному классу или подклассу антител, в то время как остальная(ые) часть(и) цепи идентична(ы) или гомологична(ы) соответствующим последовательностям антител, полученных из другого вида или относящихся к другому классу или подклассу антител, в равной степени как и фрагментов таких антител, пока они проявляют желаемую антагонистическую активность (Патент США № 4 816 567, который включен в настоящее описание в полном объеме).

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

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

In vitro-методы также подходят для получения моновалентных антител. Расщепление антител для получения их фрагментов, в особенности Fab-фрагментов, может быть произведено при использовании стандартных методик, известных из уровня техники. К примеру, расщепление может производиться при использовании папаина. Примеры расщепления под воздействием папаина описываются в заявке WO 94/29348 и в патенте США № 4 342 566. Расщепление

антител под воздействием папаина обычно приводит к двум идентичным фрагментам, связывающимся с антигеном и называемым Fab-фрагментами, каждый из которых имеет отдельный антиген-связывающий сайт и остаточный Fc-фрагмент. В результате обработки пепсином получается фрагмент F(ab')₂ и фрагмент pFc'.

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

Антитела по изобретению могут далее включать гуманизированные антитела или человеческие антитела. Гуманизированные формы нечеловеческих (например, мышинных) антител - это химерные иммуноглобулины, иммуноглобулиновые цепи или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab' или другие антиген-связывающие субпоследовательности антител), которые содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого иммуноглобулина. Гуманизированные антитела включают человеческие иммуноглобулины (антитело-реципиент), в которых остатки из комплементарных детерминантных областей

(CDR) реципиента замещены остатками из CDR биологических видов, не являющихся человеком (донорское антитело), таких как мыши, крысы или кролики, имеющими желаемую специфичность, аффинность и связывающая способность. В некоторых случаях остатки Fv-каркаса (FR) человеческого иммуноглобулина замещены соответствующими остатками нечеловеческого происхождения. Гуманизированные антитела могут также включать остатки, которые не встречаются ни в антителе-реципиенте, ни в импортированном CDR или каркасных последовательностях. Как правило, гуманизированное антитело будет включать по сути все из по меньшей мере одного и, как правило, двух переменных доменов, в которых все или по существу все участки CDR соответствуют таковым нечеловеческого иммуноглобулина, и все или по сути все из участков FR являются таковыми консенсусной последовательности иммуноглобулина человека. Оптимально, чтобы гуманизированное антитело содержало также по меньшей мере часть константного участка иммуноглобулина (Fc), как правило, человеческого иммуноглобулина.

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

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

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

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

терапевтические эффекты. Предпочтительными являются местное или внутривенное введение.

Эффективная дозировка и режим введения антител могут быть определены эмпирически, а принятие таковых решений под силу специалисту данной области. Специалистам данной области будет понятно, что дозировка антител, которые должны быть введены, будет варьироваться в зависимости от, например, субъекта, которому будет вводиться антитело, способа введения, конкретного типа используемого антитела и других вводимых медикаментов. Типичная суточная доза антител при монотерапии антителами может варьироваться от около 1 мкг/кг вплоть до 100 мг/кг массы тела или более в день, в зависимости от факторов, упоминаемых выше. После введения антитела, предпочтительно для лечения острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия, эффективность терапевтического антитела может быть оценена различными способами, известными компетентному специалисту данной области. Например, размер, количество и/или распределение рака у субъекта, проходящего лечение, может контролироваться с помощью стандартных методов визуализации опухоли. Введенное в терапевтических целях антитело, которое блокирует рост опухоли, приводит к уменьшению размера и/или предотвращает развитие новых опухолей в сравнении с течением болезни, которое бы имело место без введения антитела, и является эффективным антителом для лечения рака.

В другом аспекте изобретения предложен способ получения растворимого Т-клеточного рецептора (ТКР), распознающего конкретный комплекс пептида и МНС.

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

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

Эти антитела или ТКР могут также применяться для диагностики *in vivo*. Как правило, антитело помечают радионуклеотидом (таким как ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^3H , ^{32}P или ^{35}S), так что опухоль может быть локализована с помощью иммуноскинтиграфии. В одном варианте осуществления антитела или их фрагменты связываются с внеклеточными доменами двух или более мишеней

белка, выбранного из группы, состоящей из указанных выше белков, при показателе аффинности (K_d) ниже чем 1×10 мкМ.

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

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

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

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

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

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

Если антигенпрезентирующая клетка трансфицирована для экспрессии такого эпитопа, то предпочтительно, чтобы клетка включала вектор экспрессии, способный экспрессировать пептид, содержащий последовательности с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 383 и с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 499 или вариант его аминокислотной последовательности.

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

При получении Т-клеток могут быть также использованы аллогенные клетки, и этот способ подробно описывается в патентной заявке WO 97/26328, включенной сюда путем ссылки. Например, кроме клеток дрозифилы и Т2-клеток, для презентации антигенов могут использоваться другие клетки, такие как клетки яичника китайского хомяка (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 разработка мозаичного вируса китайской вигны как высокопродуктивной системы презентации чужеродных пептидов.

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

Активированные Т-клетки, полученные с помощью приведенного выше способа, будут селективно распознавать клетку, которая абберрантно экспрессирует полипептид, включающий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 383 и с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 499.

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 абберрантно 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)).

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

Под понятием «аберрантно экспрессированный» авторы изобретения подразумевают также, что полипептид экспрессирован в избытке по сравнению с уровнями экспрессии в нормальных тканях, или что ген является «молчащим» в ткани, из которой образовалась опухоль, однако он экспрессирован в опухоли. Под понятием «экспрессирован в избытке» авторы изобретения понимают, что полипептид представлен на уровне, который, по меньшей мере, в 2 раза выше уровня, представленного в нормальной ткани; предпочтительно, по меньшей мере, в 3 раза и, более предпочтительно, по меньшей мере, в 5 или 10 раз выше уровня, представленного в нормальной ткани.

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

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

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

Данная сконструированная 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, ускользящими от иммунного ответа. Поэтому любая молекула по настоящему изобретению может применяться в качестве медикамента или в производстве медикамента. Молекула может быть использована сама по себе или в комбинации с другой(ими) молекулой(ами) по изобретению или известной(ыми) молекулой(ами).

В настоящем изобретении также предложен комплект, включающий:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Настоящий состав подходит для введения пептидов любым приемлемым способом, таким как оральный (энтеральный), назальный, глазной, подкожный, 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 острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря,

глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия, медикамент по изобретению предпочтительно используется для лечения острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия.

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

«Персонализированный фармацевтический препарат» подразумевает разработанные специально для отдельного пациента терапевтические средства, которые будут применяться исключительно для лечения такого пациента, включая

активно персонализированные противораковые вакцины и средства адоптивной клеточной терапии с использованием аутологичной ткани пациента.

В контексте настоящего изобретения термин «хранилище» относится к группе или набору пептидов, которые предварительно прошли скрининг на иммуногенность и/или избыточную презентацию в конкретном виде опухоли. Понятие «хранилище» не подразумевает, что конкретные пептиды, включенные в вакцину, были изготовлены заблаговременно и хранились в реальном помещении, хотя эта возможность также принимается во внимание. Во внимание определено принимается тот факт, что пептиды могут быть изготовлены *de novo* для каждой производимой индивидуализированной вакцины, или могут быть получены заранее и находиться на хранении. Хранилище (например, в форме банка данных) состоит из опухолиассоциированных пептидов, которые в высокой степени избыточно экспрессировались в опухолевой ткани пациентов с различными HLA-A, HLA-B и HLA-C-аллелями, больных острым миелоидным лейкозом, раком молочной железы, холангиоцелочной карциномой, хроническим лимфоцитарным лейкозом, колоректальным раком, раком желчного пузыря, глиобластомой, раком желудка, гепатоклеточной карциномой, плоскоклеточной карциномой головы и шеи, меланомой, неходжкинской лимфомой, раком легких (в том числе немелкоклеточным раком легких-аденокарциномой, плоскоклеточным немелкоклеточным раком легких и мелкоклеточным раком легких), раком яичника, раком пищевода, раком поджелудочной железы, раком предстательной железы, почечно-клеточной карциномой, карциномой мочевого пузыря и раком матки и эндометрия. Оно может содержать пептиды, связанные с молекулами MHC I класса и MHC II класса или удлиненные пептиды, связанные с молекулами MHC I класса. Помимо опухолиассоциированных пептидов, собранных из нескольких тканей острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы,

плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия, хранилище может содержать маркерные пептиды HLA-A*02, HLA-A*01, HLA-A*03, HLA-A*24, HLA-B*07, HLA-B*08 и HLA-B*44. Эти пептиды позволяют произвести количественное сравнение интенсивности Т-клеточного иммунного ответа, индуцированного пептидами TUMAP, и, следовательно, позволяют сделать важный вывод о способности вакцины вызывать противоопухолевые ответы. Во-вторых, они выполняют функцию важных пептидов положительного контроля, полученных «не из собственного» антигена в случае, если у пациента не наблюдаются вызванные вакциной Т-клеточные ответы на пептиды TUMAP, полученные из «собственных» антигенов. И в-третьих, оно может позволить сделать заключения относительно статуса иммунокомпетентности пациента.

Пептиды TUMAP для хранилища были идентифицированы с помощью интегрированного подхода функциональной геномики, комбинирующего анализ экспрессии генов, масс-спектрометрию и Т-клеточную иммунологию (XPresident®). Этот подход гарантирует, что только те пептиды TUMAP, которые действительно присутствуют в большом проценте опухолей, но не экспрессируются или экспрессируются лишь минимально на нормальной ткани, были выбраны для последующего анализа. В целях первоначального отбора пептидов образцы ткани острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия, 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 острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия), 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, презентруемые в избытке или селективно презентруемые на опухолевой ткани, предпочтительно кодируемые селективно экспрессированными или экспрессированными в избытке генами, выявленными на этапе 2, считали подходящими TUMAP-кандидатами для мультипептидной вакцины.
4. Было произведено изучение литературы для выявления дополнительных свидетельств, подтверждающих релевантность идентифицированных в качестве TUMAP пептидов.
5. Релевантность избыточной экспрессии на уровне мРНК подтверждали повторным обнаружением выбранных на этапе 3 пептидов TUMAP на опухолевой ткани и отсутствием (или нечастым обнаружением) на здоровых тканях.
6. В целях оценки того, может ли быть осуществима индукция *in vivo* Т-клеточных ответов выбранными пептидами, были проведены анализы иммуногенности *in vitro* при использовании человеческих Т-клеток здоровых доноров, а также пациентов, больных острым миелоидным лейкозом, раком молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хроническим лимфоцитарным лейкозом, колоректальным раком, раком желчного пузыря, глиобластомой, раком желудка,

гепатоклеточной карциномой, плоскоклеточной карциномой головы и шеи, меланомой, неходжкинской лимфомой, раком легких (в том числе немелкоклеточным раком легких-аденокарциномой, плоскоклеточным немелкоклеточным раком легких и мелкоклеточным раком легких), раком яичника, раком пищевода, раком поджелудочной железы, раком предстательной железы, почечно-клеточной карциномой, карциномой мочевого пузыря, раком матки и эндометрия.

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

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

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

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

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

Помимо этого, или в качестве альтернативы этому, при выборе пептидов с использованием модели хранилища (банка данных) пептиды TUMAP могут быть

идентифицированы у пациента *de novo* и затем быть включены в вакцину. В качестве одного примера: пептиды-кандидаты TUMAP могут быть идентифицированы у пациента с помощью (a1) сравнения данных по экспрессии в опухолевом образце с данными нормальной ткани, соответствующей типу ткани опухолевого образца, для идентификации белков, которые в опухолевом образце экспрессируются в избытке или абберрантно; и (a2) установления корреляции между данными экспрессии и последовательностями лигандов МНС, связанных с молекулами МНС I и/или II класса в опухолевом образце, в целях идентификации лигандов МНС, которые получены из белков, избыточно или абберрантно экспрессируемых опухолью. В качестве другого примера: могут быть идентифицированы белки, имеющие мутации, являющиеся уникальными для опухолевого образца, соотносимого с соответствующей нормальной тканью отдельного пациента, и могут быть идентифицированы пептиды TUMAP, специфической мишенью которых является мутация. Например, геном опухоли и соответствующей нормальной ткани могут быть секвенированы методом полногеномного секвенирования: для обнаружения несинонимичных мутаций на кодирующих белок участках генов геномную ДНК и РНК экстрагируют из опухолевых тканей, а нормальную, не имеющую мутаций геномную ДНК зародышевой линии экстрагируют из мононуклеарных клеток периферической крови (МПК). Применяемый подход секвенирования нового поколения (NGS) заключается в повторном секвенировании кодирующих белок участков (повторное секвенирование 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 генной экспрессии и подтверждения того, что мутировавшие гены экспрессированы в опухолях пациентов. Считывание полученных в результате миллионов последовательностей осуществляется алгоритмами программного обеспечения. Получаемый список содержит мутации и экспрессию генов. Опухолеспецифические соматические мутации определяют сравнением с вариантами зародышевой линии из МКПК и устанавливают

приоритетность. Идентифицированные *de novo* пептиды могут быть затем испытаны на иммуногенность, как описывается выше в случае хранилища, 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), презентуемых опухолевым образцом отдельного пациента способами, описанными выше; (б) сравнения пептидов, идентифицированных на этапе (а) с хранилищем пептидов, как описано выше, которые предварительно прошли скрининг на иммуногенность и избыточную презентацию в опухолях по сравнению с соответствующими нормальными тканями; (в) выбора по меньшей мере одного пептида из хранилища, который коррелирует с опухолеассоциированным пептидом, идентифицированным у пациента; и (г) факультативно, выбора по меньшей мере одного пептида, идентифицированного *de novo* на этапе (а) с подтверждением его иммуногенности.

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

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

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

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

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

Кроме того, пептиды по настоящему изобретению пригодны не только для лечения рака, но и также в качестве диагностических средств. Так как пептиды были получены из клеток острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия, 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 ткань образца является злокачественной или воспаленной или пораженной

заболеванием вообще, или же может использоваться в качестве биомаркера острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия. 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 обследований в рамках последующего наблюдения после трансплантации, к примеру, для выявления реакций «хозяин против трансплантата» и «трансплантат против хозяина».

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

ФИГУРЫ

На Фигурах 1A–1I представлена избыточная презентация различных пептидов в различных раковых тканях (черные точки). Верхняя часть: Медианные показатели интенсивности МС-сигналов измерений технических репликатов нанесены в виде точек для единичных HLA-B*07-положительных образцов нормальной ткани (серые точки, левая часть изображения) и опухолевых образцов (черные точки, правая часть изображения), на которых был обнаружен пептид. Прямоугольниками («ящичками») обозначены медианное значение, 25-ый и 75-ый процентиля нормализованного уровня интенсивности сигнала, тогда как «усы» распространяются до самой низкой точки данных, всё еще в пределах 1,5 межквартильного диапазона (IQR) нижнего квартиля и до наивысшей точки данных, всё еще в пределах 1,5 IQR верхнего квартиля. Нормальные органы расположены в соответствии с категориями риска (клетки крови, кровеносные сосуды, головной мозг, печень, легкие: высокий уровень риска, серые точки; все остальные органы: средний уровень риска; серые точки). Нижняя часть: Относительная частота обнаружения пептида в каждом органе представлена в виде столбчатой диаграммы. Цифры под графиком обозначают число образцов, на которых был обнаружен пептид из общего числа проанализированных образцов для каждого органа (N = 87 для образцов нормальных тканей, N = 149 для образцов опухолевых

тканей). Если пептид был обнаружен на образце, но по техническим причинам не могло быть проведено количественное определение, образец включали в данный график репрезентации частоты обнаружения, но в верхней части фигуры точку не обозначали. Ткани (слева направо): Нормальные образцы: клетки крови; кров. сосуды (кровеносные сосуды); голов. мозг (головной мозг); сердце; печень; легкие; надпочечник; желчн. прот. (желчные протоки); мочев. п. (мочевой пузырь); КМ (костный мозг); пищевод; желчн. пуз. (желчный пузырь); толст. киш. (толстая кишка); тонк. киш. (тонкая кишка); почка; ЛУ (лимфатический узел); периф. нерв (периферический нерв); подж. железа (поджелудочная железа); гипофиз; кожа; спинной мозг; селезенка; желудок; щитов. жел. (щитовидная железа); трахея. Опухолевые образцы: ОМЛ (острый миелоидный лейкоз); РМЖ (рак молочной железы); ХГК (холангиоцелочная карцинома); ХЛЛ (хронический лимфоцитарный лейкоз); КРК (колоректальный рак); РЖП (рак желчного пузыря); ГБМ (глиобластома); РЖ (рак желудка); ГКК (гепатоклеточная карцинома); ПлККГШ (плоскоклеточная карцинома головы и шеи); МЕЛ (меланома); НХЛ (неходжкинская лимфома); НМРЛадено (немелкоклеточный рак легких - аденокарцинома); НМРЛдругие (образцы НМРЛ, которые не могут быть однозначно отнесены к НМРЛадено и НМРЛплоск); НМРЛплоск (плоскоклеточный немелкоклеточный рак легких); РЯ (рак яичника); РП (рак пищевода); РПЖ (рак поджелудочной железы); РПрЖ (рак предстательной железы); ПКК (почечноклеточная карцинома); МРЛ (мелкоклеточный рак легких); КМП (карцинома мочевого пузыря); РЭМ (рак эндометрия и матки).

Фигура 1A) пептид: TPRIGPKVSL (SEQ ID NO: 206), Фигура 1B) пептид: RPILKEQSSSSF (SEQ ID NO: 246), Фигура 1C) пептид: RPDVVRTLL (SEQ ID NO: 308), Фигура 1D) пептид: SPSLQSSRESL (SEQ ID NO: 312), Фигура 1E) пептид: NPREPEKSL (SEQ ID NO: 316), Фигура 1F) пептид: VPPQNPRPSL (SEQ ID NO: 335), Фигура 1G) пептид: IPTSRVITL (SEQ ID NO: 337), Фигура 1H) пептид: KPRATWTL (SEQ ID NO: 353), Фигура 1I) пептид: SPRRLVELAGQSL (SEQ ID NO: 359).

На Фигурах 2А – 2Т представлены примеры профилей экспрессии исходных генов настоящего изобретения, которые экспрессированы в избытке в различных раковых образцах. Опухолевые (черные точки) и нормальные (серые точки) образцы сгруппированы по органам происхождения. на диаграммах размаха («ящик с усами») представлены медиана, 25-ый и 75-ый процентиля (ящик) значений RPKM плюс усы, которые распространяются до самой низкой точки данных, всё еще в пределах 1,5 межквартильного диапазона (IQR) нижнего квартиля и до наивысшей точки данных, всё еще в пределах 1,5 IQR верхнего квартиля. Нормальные органы расположены в соответствии с категориями риска. FPKM = фрагментов на тысячу пар оснований на миллион картированных ридов. Нормальные образцы: клетки крови; кровен. сосуды (кровеносные сосуды); головной мозг; сердце; печень; легкое; жировая ткань; надпочечник; желчн. прот. (желчные протоки); мочев. п. (мочевой пузырь); КМ (костный мозг); пищевод; глаз; желчн. пуз. (желчный пузырь); голова и шея; толст. киш. (толстая кишка); тонк. киш. (тонкая кишка); почка; ЛУ (лимфатический узел); периф. нерв (периферический нерв); подж. железа (поджелудочная железа); парацит. (парацитарная железа); брюшина; гипофиз; плевра; скел. мышца (скелетная мышца); кожа; селезенка; желудок; щитов. жел. (щитовидная железа); трахея; мочеточник; молочн. жел. (молочная железа); яичник; плацента; предст. жел. (предстательная железа); семенник; вилочк. жел. (вилочковая железа); матка. Опухолевые образцы: ОМЛ (острый миелоидный лейкоз); РМЖ (рак молочной железы); ХГК (холангиоцеллюлярная карцинома); ХЛЛ (хронический лимфоцитарный лейкоз); КРК (колоректальный рак); РЖП (рак желчного пузыря); ГБМ (глиобластома); РЖ (рак желудка); ГКК (гепатоцеллюлярная карцинома); ПлККГШ (плоскоклеточная карцинома головы и шеи); МЕЛ (меланома); НХЛ (неходжкинская лимфома); НМРЛадено (немелкоклеточный рак легких - аденокарцинома); НМРЛдругие (образцы НМРЛ, которые не могут быть однозначно отнесены к НМРЛадено и НМРЛплоск); НМРЛплоск (плоскоклеточный немелкоклеточный рак легких); РЯ (рак яичника); РП (рак пищевода); другие (другие виды рака, например, множественная миелома); РПЖ (рак поджелудочной железы); РПрЖ (рак предстательной железы); ПКК (почечноклеточная карцинома);

МРЛ (мелкоклеточный рак легких); КМП (карцинома мочевого пузыря); РЭМ (рак эндометрия и матки).

Фигура 2А) Символ гена: KLK2, пептид: RPRSLQCVSL (SEQ ID No.: 1), Фигура 2В) Символ гена: TGM4, пептид: GPKKFIVKL (SEQ ID No.: 4), Фигура 2С) Символ гена: PRAME, пептид: LPSLSHCSQL (SEQ ID No.: 5), Фигура 2D) Символ гена: MMP12, пептид: AVHEIGHSL (SEQ ID No.: 14), Фигура 2E) Символ гена: FAM178B, пептид: WPRLPGAGL (SEQ ID No.: 19), Фигура 2F) Символ гена: LOC645382/LOC645399/PRAMEF10, пептид: APSRLLEL (SEQ ID No.: 21), Фигура 2G) Символ гена: MAGEC1, пептид: SPSFSSTLLSL (SEQ ID No.: 26), Фигура 2H) Символ гена: CYP4Z1/CYP4Z2P, пептид: FPAPPAHWF (SEQ ID No.: 16), Фигура 2I) Символ гена: UPK2, пептид: APLLPIRTLPL (SEQ ID No.: 58), Фигура 2J) Символ гена: ALPPL2, пептид: DAAHPGPSV (SEQ ID No.: 82), Фигура 2K) Символ гена: MMP1, пептид: HAIEKAFQL (SEQ ID No.: 90), Фигура 2L) Символ гена: COL10A1, пептид: TPIPFDKILY (SEQ ID No.: 100), Фигура 2M) Символ гена: LAMC2, пептид: RSYQHSLRL (SEQ ID No.: 116), Фигура 2N) Символ гена: LAMC2, пептид: SPQLSYFEY (SEQ ID No.: 137), Фигура 2O) Символ гена: SLC45A2, пептид: VPFNLITEY (SEQ ID No.: 138), Фигура 2P) Символ гена: QRFPR, пептид: HPFKMKWQY (SEQ ID No.: 142), Фигура 2Q) Символ гена: KBTBD8, пептид: TPMTVPRI (SEQ ID No.: 159), Фигура 2R) Символ гена: KBTBD8, пептид: YAYTSRVIL (SEQ ID No.: 166), Фигура 2S) Символ гена: NLRP2, пептид: LPKAALLV (SEQ ID No.: 241), Фигура 2T) Символ гена: DCAF4L2, пептид: APSMLRKNQL (SEQ ID No.: 358). На Фигурах 3А–3G представлены типичные результаты ответов *in vitro* пептид-специфических CD8⁺ Т-клеток здорового HLA-A*07⁺ донора. CD8⁺ Т-клетки примировали с помощью искусственных АПК, нагруженных моноклональными антителами к CD28 и HLA-A*07 в комплексе с пептидом с последовательностью SEQ ID No. 388 (SPSVSQLSVL) (Фигура 3А, левая секция), пептидом с последовательностью SEQ ID No.: 406 (LPDGSRVEL) (Фигура 3В, левая секция), пептидом с последовательностью SEQ ID No.: 23 (VPRPTSTVGL) (Фигура 3С, левая секция), пептидом с последовательностью SEQ ID No.: 33 (LPRGLSPARQL) (Фигура 3D, левая секция), пептидом с последовательностью SEQ ID No.: 61 (LPRIPFSTF)

(Фигура 3E, левая секция), пептидом с последовательностью SEQ ID No.: 64 (VPRPIFSQLYL) (Фигура 3F, левая секция), пептидом с последовательностью SEQ ID No.: 68 (FPNEVSVVL) (Фигура 3G, левая секция). После трех циклов стимуляции обнаружение клеток, реагирующих с пептидом, производилось с помощью двойного окрашивания мультимерами A*07/SEQ ID No.: 388 (Фигура 3A), B*07/ SEQ ID No.: 406 (Фигура 3B), B*07/ SEQ ID No.: 23 (Фигура 3C), B*07/ SEQ ID No.: 33 (Фигура 3D), B*07/ SEQ ID No.: 61 (Фигура 3E), B*07/ SEQ ID No.: 64 (Фигура 3F) или B*07/ SEQ ID No.: 68 (Фигура 3G). Правые секции (Фигура 3A–3G) представляют собой контрольное окрашивание клеток, простимулированных нерелевантными комплексами пептида и B*07. Из числа отдельных жизнеспособных клеток путем гейтирования выделяли CD8+ лимфоциты. Гейты Буля помогали исключить ложноположительные ответы, обнаруженные с помощью мультимеров, специфических в отношении различных пептидов. Указывается частота выявления специфических мультимер-положительных клеток среди CD8+ лимфоцитов.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1:

Идентификация и количественное определение опухолеассоциированных пептидов, презентруемых на поверхности клетки

Образцы тканей

Опухолевые ткани пациентов были получены из: Asterand (Детройт, Мичиган, США и Ройстон, Хартфордшир, Великобритания), Bio-Options Inc. (Бри, Калифорния, США), BioServe (Белтсвилль, Мэриленд, США), Conversant Bio (Хантсвилл, Алабама, США), Geneticist Inc. (Глендейл, Калифорния, США); Медицинского университета префектуры Киото (Киото, Япония), Осакского городского университета (Осака, Япония), ProteoGenex Inc. (Кальвер-Сити, Калифорния, США), Стэнфордский онкологический центр (Стэнфорд, Калифорния, США), Tissue Solutions Ltd (Глазго, Великобритания), Университетской клиники г. Бонн (Бонн, Германия), Университетской клиники г. Женева (Женева, Швейцария), Университетской

клиники г. Гейдельберг (Гейдельберг, Германия) и Университетской клиники г. Тюбинген (Тюбинген, Германия).

Нормальные ткани были получены из: Asterand (Детройт, Мичиган, США и Ройстон, Хартфордшир, Великобритания), BioServe (Белтсвилл, Мэриленд, США), Capital BioScience Inc. (Роквилл, Мэриленд, США), Центра клинической трансфузиологии г. Тюбингена (Тюбинген, Германия), Geneticist Inc. (Глендейл, Калифорния, США), Медицинского университета префектуры Киото (Киото, Япония), ProteoGenex Inc. (Кальвер-Сити, Калифорния, США), Tissue Solutions Ltd (Глазго, Великобритания), Университетской клиники г. Тюбинген (Тюбинген, Германия)

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

Выделение пептидов HLA из образцов тканей

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

Масс-спектрометрический анализ

Полученные пулы комплексов пептид-HLA были разделены в соответствии с их гидрофобностью обратнофазовой хроматографией (nanoAcquity UPLC system, Waters), и элюированные пептиды анализировали на гибридных масс-спектрометрах LTQ-velos и -fusion (ThermoElectron), снабженном источником ESI. Пулы пептидов наносили непосредственно на аналитическую микрокапиллярную

колонку из плавленного кварца (75 мкм в/д x 250 мм) с обращеннофазовым сорбентом 1,7 мкм C18 (Waters) с применением скорости потока в 400 нл в минуту. Затем пептиды разделяли с использованием двухэтапного 180-минутного бинарного градиента от 10% до 33% растворителя В при скорости потока 300 нл в минуту. 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 были интерпретированы с помощью программ SEQUEST с фиксированным уровнем ложноположительных обнаружений ($q \leq 0,05$) и дополнительным контролем в ручном режиме. В случае, если идентифицированная последовательность пептида была неопределенной, ее дополнительно подтверждали сравнением полученной картины фрагментации природного пептида с картиной фрагментации синтетического контрольного пептида с идентичной последовательностью.

Относительное количественное определение методом ЖХ/МС без изотопных меток проводили путем подсчета ионов, т. е. с помощью экстракции и анализа результатов ЖХ/МС (Mueller et al., 2007). Этот метод основан на предположении, что площадь пика ЖХ/МС сигнала пептида коррелирует с его концентрацией в образце. Извлеченные характеристики обрабатывали с помощью деконволюционного анализа состояния заряда и путем выравнивания времени удерживания (Mueller et al., 2008; Sturm et al., 2008). Наконец, все результаты спектров ЖХ/МС были сопоставлены методом перекрестных ссылок с результатами по идентификации последовательности, чтобы объединить количественные данные различных образцов и тканей в профили презентации пептидов. Количественные данные были нормализованы с применением

двухуровневой системы в соответствии с центральной тенденцией с целью учета вариабельности внутри технических и биологических повторных измерений. Таким образом, каждый идентифицированный пептид может быть ассоциирован с количественными данными, позволяющими провести относительную количественную оценку образцов и тканей. Кроме того, все количественные данные, полученные для пептидов-кандидатов, были проконтролированы вручную в целях обеспечения взаимной согласованности данных и для проверки точности автоматического метода анализа. Для каждого пептида был рассчитан профиль презентации, показывающий средний уровень презентации в образце, а также вариабельность репликатов. В профиле сравниваются образцы острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия с фоновым уровнем образцов нормальной ткани. Профили презентации типичных пептидов, презентуемых в избытке, показаны на Фигурах 1А-1I.

В Таблицах 8а и 8б показана презентация выбранных пептидов при различных раковых заболеваниях и, таким образом, конкретная значимость упомянутых пептидов для диагностики и/или лечения указанных раковых заболеваний (например, пептида с последовательностью SEQ ID NO: 22 для плоскоклеточной карциномы головы и шеи и рака пищевода, пептида с последовательностью SEQ ID NO: 34 для рака молочной железы и рака матки и эндометрия).

Таблица 8а. Сводка данных презентации выбранных опухолеассоциированных пептидов по настоящему изобретению среди различных видов опухолей.

ОМЛ: острый миелоидный лейкоз; РМЖ: рак молочной железы; ХГК: холангиоцеллюлярная карцинома; ХЛЛ: хронический лимфоцитарный лейкоз; КРК: колоректальный рак; РЖП: рак желчного пузыря; ГБМ: глиобластома; РЖ: рак желудка; ГКК: гепатоцеллюлярная карцинома; ПлККГШ: плоскоклеточная карцинома головы и шеи; МЕЛ: меланома; НХЛ: неходжкинская лимфома; НМРЛадено: немелкоклеточный рак легких - аденокарцинома; НМРЛдругие: образцы НМРЛ, которые не могут быть однозначно отнесены к НМРЛадено и НМРЛплоск; НМРЛплоск: плоскоклеточный немелкоклеточный рак легких; РЯ: рак яичника; РП: рак пищевода; РПЖ: рак поджелудочной железы; РПрЖ: рак предстательной железы; ПКК: почечноклеточная карцинома; МРЛ: мелкоклеточный рак легких; КМП: карцинома мочевого пузыря; РЭМ: рак эндометрия и матки.

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептидов при раковых заболеваниях
1	RPRSLQCVSL	РПрЖ
2	VPGSDPARYEFL	РП
3	MPYVVLTAAL	ПКК
4	GPKKFIVKL	РПрЖ
5	LPSLSHCSQL	МЕЛ
6	LPLNSSTSL	МРЛ
8	MPKTNLSKM	ПлККГШ
12	LPNTGRIGQLL	НМРЛадено
13	LPNTGRIGQL	РПрЖ
14	AVHEIGHSL	НМРЛадено
15	KPGFNISIL	РМЖ
16	FPAPPAHWF	РМЖ
17	SPAAPLSPASSL	КМП
18	MALSVLRLAL	РЖП, РЖ, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, РПрЖ, МРЛ
20	MVLGIGPVL	КРК, РЖП, ПлККГШ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, МРЛ, РЭМ
21	APSRLEEL	ГКК
22	LPQLKPAL	ПлККГШ, РП
23	VPRPTSTVGL	МЕЛ
24	VPRPTSTVGLFL	МЕЛ
25	RPQGAVGGL	ГКК
27	RIRVTSEVL	РМЖ
29	APLRVHITSL	МЕЛ
31	RPGPSDPAA	НМРЛадено
32	APMAPGRSPL	РЭМ

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептидов при раковых заболеваниях
33	LPRGLSPARQL	РЭМ
34	APMAPGRSP	РМЖ, РЭМ
35	APLPPRAL	ГБМ
36	RPFSREMDL	ОМЛ, РЯ
38	RPSFPNLTSF	ОМЛ, РЯ
39	QPRPSSEKI	ОМЛ
40	FPRTVKHIDAAL	КРК
42	APLKMLAL	МЕЛ, РЯ
43	APTPRPKVL	РМЖ
45	TRPWSGPYIL	МЕЛ
46	QPISGNPVTL	НХЛ, НМРЛплоск, МРЛ, КМП
47	RPRQTGALM	ОМЛ
48	RPRYSIGL	РМЖ
49	APEKARAFL	РП
50	PEKARAFL	РП
51	SPVFYVQTL	РМЖ
53	SPRIPFSTF	МЕЛ
54	VPSCGRSVEGL	ХЛЛ, РЖП, НХЛ, НМРЛадено, ПЯ, РП, РПЖ, ПКК, РЭМ
55	LPALLRSGL	ХГК, РЖП, ГКК, ПлККГШ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РП, ПКК, МРЛ
56	LPALLRSGLTL	РМЖ, ХГК, КРК, РЖП, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, РЯ, РП, ПКК
57	APLLPIRTL	КМП
58	APLLPIRTLPL	КМП
59	KPRTIYSSL	РП, РЭМ
60	RPYSIYPHGVTF	ХГК, РЖП, ГКК
61	LPRIPFSTF	МЕЛ
63	FPHMATTAF	ПлККГШ
64	VPRPIFSQLYL	НХЛ, РЭМ
65	FPNVYSTLVL	МЕЛ
66	LPMTVISVL	РЖП
67	VPVSRPVL	ХЛЛ, НХЛ
68	FPNEVSVVL	РМЖ, МЕЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РП
69	RPEDGRPRL	ГБМ
70	VPAQRLGLL	ОМЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РП
71	APFAPLHGGGSL	РПрЖ
72	APCNGNVAV	РМЖ, НМРЛадено
73	LPVSSPVTL	РМЖ, НМРЛплоск
74	VPVSHPVL	ХЛЛ, НХЛ

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептидов при раковых заболеваниях
76	KPKVESQAL	PMЖ
77	QPRLVPGETL	РЖП, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск
78	HPSQESPTL	НМРЛплоск, РЯ, ПКК, КМП, РЭМ
79	GPASDHPSL	РЯ, РПрЖ, РЭМ
80	SALPTTISF	ПлККГШ, РП, МРЛ
82	DAAHPGPSV	РЭМ
83	AVSSHNNVI	ПКК
84	MPMQDIKMI	РЭМ
85	MPMQDIKMILKM	РЯ, МРЛ
86	ALLLRGVTL	МРЛ
87	APVGGNVTSSF	РП
88	KPSAVKDSIY	ПлККГШ, ПКК
89	FLIPRAGWLAGL	КРК
90	HAIEKAFQL	КРК
91	FPRLVGPdff	РЯ
92	TSPLPPTV	ОМЛ, ПлККГШ
93	SVAIAHGvf	ХЛЛ, КРК
94	LPMSKRQEY	РЯ
95	RTKEEINEL	НМРЛадено
96	QPslvQAIF	РЯ
97	LPPGTQIQI	КРК
98	FPCSALLACF	РП
99	MPVSAFTVI	РЖ, НМРЛплоск
100	TRIPFDKILY	РП
101	KPGLPGLK	PMЖ, КРК, ГБМ, ГКК, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РП, ПКК, МРЛ, КМП, РЭМ
102	MAGPAIHTAPM	ПлККГШ
105	RPRYETGVCA	КРК
106	APFHIDRLF	РЯ, ПКК
107	GQRLESPGGAA	ОМЛ, ХГК, ХЛЛ, КРК, РЖП, ГКК, ПлККГШ, НМРЛплоск, РПЖ, КМП, РЭМ
108	APRGSPPI	ГКК, РЯ, РП, РПЖ, ПКК
110	YPSSPASAV	РЖ
111	YPLQQTNVY	ПКК
112	YPSPLNKHSF	ПКК
114	FVPPSGPSNPM	ПлККГШ
115	KTKSLAQQl	КРК, НМРЛадено, РЭМ
116	RSYQHSLRL	КРК
117	IPHQRSSL	ХЛЛ
118	NPERHKPSF	ОМЛ

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептидов при раковых заболеваниях
119	KATEYVHSL	КРК, РЭМ
120	TVRPKNAAL	ОМЛ, ГКК, РП, РЭМ
121	GPFQRAAL	РЭМ
122	KPRTPFTTAQLL	РЭМ
123	RPRLRDLPAL	ХЛЛ, РЖП, НХЛ, РЯ, РП, ПКК
124	KTIDGHINL	КРК, НМРЛадено, НМРЛдругие
125	SPAKQFNIY	МРЛ
126	MPREDAHF	МЕЛ
127	KSKQVITLL	НМРЛплоск
128	SPPATLFLFLL	РП
129	MTLPATTLTL	РМЖ, ХГК, ХЛЛ, КРК, РЖП, ГБМ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, ПКК, МРЛ, КМП, РЭМ
130	GAYDKARYL	РМЖ
131	MPFRNIRSIL	ГКК
132	LPRLPVGSLV	РЖ
133	LPELPTTLTF	НМРЛадено
134	VAAAARLTL	МЕЛ
135	MPRLLRLSL	РЭМ
136	QPDHAGIFRVF	ПлККГШ, РП
137	SPQLSYFEY	РП
138	VPFNLITEY	МЕЛ
139	LVILQHQAM	ПКК
140	TRFPDIHWF	НМРЛплоск, ПКК, МРЛ
141	YGPYGGSGGW	РЖ
142	HPFKMKWQY	ПКК
143	YPMIPPAQL	МРЛ
144	RPVQGIPTY	МЕЛ
145	VPAQRLGLLL	РМЖ, ГБМ, ПлККГШ, НМРЛплоск, РЯ
146	SPTRGSEF	ГБМ
147	HVAQPAVVL	РМЖ, ГКК
148	KPHLIYRQ	ОМЛ, РМЖ, КРК, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛадено, РП, ПКК, МРЛ, РЭМ
149	SPSSVFTSK	РМЖ
150	APLHGGGSL	РПрЖ
151	QPTWNTQTRL	НХЛ
152	SSASFSSSELFRRH	РМЖ, ХГК, РП, РПЖ, МРЛ, РЭМ
153	QPVHSLCSA	РЖ
154	RPPPSRRAVL	ГБМ
155	APIPRLIEG	РП

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептидов при раковых заболеваниях
156	GSRPVTGSV	PMЖ
157	RPVTGSVC	PMЖ, HMPЛадено
158	SVPVATVEL	ХЛЛ
159	TPMTVPRI	ХЛЛ, НХЛ
160	IPVSHPVLTf	PMЖ, КРК, ГБМ, ГКК, НХЛ, HMPЛадено
161	ASKILETSL	МЕЛ
163	FRYPNGVSL	ГКК
164	RAAGRRLQL	ГКК
166	YAYTSRVIL	НХЛ
167	NVNPARKGL	ОМЛ
168	SPSGQRDVSL	МЕЛ
169	RPFSVSSISQL	МЕЛ
170	APEGKRLGF	МЕЛ
171	LPLGGHKSL	МЕЛ
172	SAQSLHPVL	ГБМ
173	VIINNPISL	HMPЛдругие
174	IPVTSSVTL	HMPЛплоск, РП
175	AAFPHKIIF	РП
176	QPLDICHSF	РЯ
177	VWEPQGSSRSL	РЭМ
178	VPYYPRANL	РП
179	PRVRLLLL	РЖП, ПлККГШ
180	RLRDYISSL	ХЛЛ, НХЛ
181	LPVSPARAL	ПлККГШ, HMPЛадено, HMPЛплоск, РП
182	RPLPVSPARAL	PMЖ, HMPЛадено, HMPЛплоск
183	VPRRPARAL	PMЖ, ГБМ, МЕЛ
184	KIIASGNHL	HMPЛдругие
185	RPVLTASSF	НХЛ
188	HAAASFETL	HMPЛадено
189	QPQCSTHIL	ХГК, ГКК, РП
190	RLAHVRARL	РЭМ
191	KPKAVKPKAA	HMPЛадено
192	IPFADVKSf	HMPЛадено, HMPЛплоск, МРЛ
193	LPALKEEAF	РПрЖ
194	HPNKIKASL	PMЖ
195	NPIFGRKEL	РЭМ
196	RPSGTAGAAL	ПлККГШ, HMPЛплоск, ПКК
197	RPSGTAGAALLA	ГКК
198	LPSPAHAFRAL	РЯ

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептидов при раковых заболеваниях
199	SPFWIHQA	ОМЛ
200	EPFHLIVSY	КРК, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РП, ПКК, МРЛ
201	LPIARVLTV	РЭМ
202	SPSREASAL	ХЛЛ, ГБМ, КМП
203	KPRGPIDI	КРК, РЖП, НМРЛадено
204	FPYSGDKILV	ОМЛ, КРК, РЖ, ГКК, МЕЛ, НМРЛплоск, РПЖ, МРЛ, КМП, РЭМ
205	LPPALLTTV	РЖ
206	TPRIGPKVSL	ОМЛ, РМЖ, ХГК, ХЛЛ, КРК, РЖП, ГБМ, РЖ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РП, РПЖ, ПКК, МРЛ, КМП, РЭМ
207	VPSDITTAFF	НМРЛадено, РП, МРЛ
208	RNRQVATAL	ХГК, КРК, РЖП, ПлККГШ
209	KIEQIRAVL	РП
210	IPENRVVSY	РП
211	IPDTIASVL	МЕЛ
212	VPYAAQAAL	РМЖ
214	LPLKFFPII	РЭМ
215	IPVAIKEL	НМРЛдругие
216	LPWEQNEQV	ГКК
217	SPGDKRLAAYL	ХГК, ГКК
218	VQRTPPPI	РЖ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РП
219	VPHTGRYTCL	ПКК
220	RPAPGPAPFV	РМЖ
221	LPQRPNARL	ХГК, КРК, РЖП, РЖ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, РПрЖ, ПКК, МРЛ, КМП, РЭМ
222	MLKTTLTAF	ГКК
223	KAHVRIEL	КРК
226	APGGSSRSSL	ОМЛ
229	FPNAGPRHLL	ОМЛ, ХЛЛ, НХЛ, РЯ, ПКК
230	DVIDDIISL	ГБМ, ГКК, ПлККГШ, НХЛ, НМРЛплоск
231	SPITLQAL	ГКК
232	TAYPSLRLL	РМЖ, ГКК, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РПЖ, МРЛ, РЭМ
233	MAYDRFIAI	КРК, РЖП, НМРЛадено, ПКК
234	HPRAPGEQQRL	РМЖ, КРК, РЭМ
235	AQNPAGTAL	МЕЛ
236	TPELKSSIL	ГКК
237	LPRAGGAF	РЖП, РЖ, НМРЛадено, РПЖ, ПКК

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептидов при раковых заболеваниях
238	LPRAGGAFLM	ПлККГШ
239	VLPRAGGAFLM	НМРЛадено
241	LPKAALLV	ХЛЛ
242	IPETASVVAI	ОМЛ, ХГК, КРК, НМРЛадено, НМРЛплоск
243	MARTGGMVVI	КРК, НМРЛадено, НМРЛплоск
244	VPAHLVAA	РЖ
245	GPVPSPLAL	РЯ
246	RPILKEQSSSSF	РЖП, ПлККГШ, НМРЛплоск, РП
247	SPVGVGQRL	МРЛ
249	SPRSGVLL	РП, РЭМ
250	APAAPAAVPS	КРК, ГБМ, РЯ
251	MPVDSFNSM	МЕЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, ПКК, МРЛ, КМП
252	QPENSLEGISL	НМРЛплоск
253	MPVDSFNSML	КРК, МЕЛ, НМРЛплоск, МРЛ, КМП
254	RVIQGT TTL	ГКК
255	VPSHWMVAL	НХЛ
256	SPVPSHWMVAL	ХЛЛ, НХЛ
257	APYGTLRKS	МЕЛ
258	SVIGPNSRL	МРЛ
259	VPMPGVQAV	РЭМ
260	LVQSSRSEV	ПлККГШ, РП
261	SPSTSRTPL	РЖП, ГБМ, ГКК, ПлККГШ, НМРЛадено
262	SPSTSRTPLLSSL	РМЖ, ХГК, РЖП, ГБМ, ГКК, ПлККГШ, НХЛ, РП, ПКК, РЭМ
263	SQRPPATSQA	ОМЛ, РМЖ, ХГК, ХЛЛ, КРК, ГБМ, ГКК, ПлККГШ, НХЛ, РЯ, РП, РПЖ, РПрЖ, ПКК
264	APRPGNWIL	МЕЛ, НМРЛплоск
266	KPYEGRVEI	ХЛЛ, ГБМ
267	MPVPGILL	МЕЛ
268	EPLSVTASY	ПлККГШ
269	FTVSSSSAM	РЖП
270	SPRGTTSTL	ХГК, КРК, РЖП, ГКК, НХЛ
271	SPTPVFTTL	КРК, РЖП
272	SSPRGTTSTL	РЖП, РП
273	TDTPSTTP TTI	ХГК, КРК, РЖП, ГБМ, ГКК, МЕЛ, НМРЛадено, РП, РПЖ, РПрЖ, ПКК, МРЛ, РЭМ
274	KPIRTGISPLAL	ХГК, ГКК
276	RPVWDV RSA	ПлККГШ
277	MPPLLIVAF	РЯ
278	LIAARGSLVL	ОМЛ, КРК, МЕЛ, НМРЛадено, РП, МРЛ, РЭМ

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептидов при раковых заболеваниях
279	APADEPRTL	НМРЛплоск
280	LPRAFLQSL	КРК, НХЛ, НМРЛплоск
281	NPRSPPATM	ОМЛ, РЯ
282	AVRLPTPNL	ОМЛ
284	RPSAPRGPP	КРК, РП
285	RITWKGLLL	НМРЛдругие
286	APARPAAAF	РМЖ, МЕЛ, НМРЛадено, РЯ, ПКК
287	SPIPRPLFL	РМЖ
288	LHAMNSLSAM	НХЛ
289	LPYEKVSRL	ХГК, НХЛ
291	SPSKSLEM	КРК
292	LPMTHRLQL	МЕЛ
293	FPYDKPLIM	РЖ, НМРЛадено
296	SPLLMQRTL	ХЛЛ, НХЛ
297	FPIKYVNDF	ПКК
298	RVLLRWISL	ГБМ
299	SPFSGGPVSF	ПКК
300	HPYSDLADV	МЕЛ
301	FPAFLEAM	МЕЛ
302	IPIDQILNSF	МЕЛ
303	RPPPPCIAL	МЕЛ
304	SPLIGDFPAF	МЕЛ
305	AASPVGSAL	ГКК
306	RPFPLALL	КРК
307	RPHQKGWLSI	ГКК
308	RPDVVRTLL	КРК, РЖП, РЖ, ПЛККГШ, МЕЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РП, РПЖ, ПКК, РЭМ
311	APRLALDPDAL	РМЖ, МРЛ
312	SPSLQSSRESL	РЖП, ПЛККГШ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РП, КМП
313	VPLSSYVSI	МЕЛ
314	IALMKLAGPL	ОМЛ, КРК, ГКК, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, РЭМ
316	NPREPEKSL	РМЖ, КРК, РЖП, РЖ, ГКК, РП, МРЛ
317	MPYNSAHHCVV	ХЛЛ, НХЛ
318	TPISNTGVL	ОМЛ, РЖП, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, ПКК
319	RPLDTFRVL	РП
320	APMHIDRNIL	ГКК
321	QPQQPGFFL	ХЛЛ
322	RAVPVGSGL	МЕЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск
323	TPHGITDIL	КРК, РЭМ
324	LPAPLRISL	РМЖ, ГБМ, МЕЛ, НМРЛадено, РЯ, РЭМ

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептидов при раковых заболеваниях
325	SPRSNPVRL	НХЛ
326	IPPFTQRVF	РЯ
327	GPRTTQSSVL	НМРЛадено
328	LPLHRGDLVI	ХЛЛ
329	QANFIVLL	РЖП
330	RPFSAIAEL	РЖП
331	SPDSAILKL	НМРЛплоск, РЭМ
332	SPYAGSTAF	ОМЛ, НМРЛадено
333	SVLPRALSL	РМЖ
334	YPLSLALHF	РЯ
335	VPPQNPRPSL	ОМЛ, ГБМ, ПлККГШ, НХЛ, НМРЛадено, РП
336	YPLQGPGLLSV	НХЛ
337	IPTSRVITL	РМЖ, ХЛЛ, ГКК, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, МРЛ
338	MPATPSLKV	ПлККГШ, РЯ, РПЖ, КМП
339	GPQRTTSV	ХГК
340	APEPRAALL	МЕЛ, НМРЛплоск, РЯ
343	RPRPPKVLGL	ОМЛ, ХГК, ГКК, МЕЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РП, ПКК, МРЛ, РЭМ
344	VPYPSPTCV	РМЖ, ГКК, РЭМ
345	SAAPPGASL	ГКК
346	IPMPRITWL	РМЖ
347	SPLEKINSF	РЖП
348	HPAPPVTSA	РЯ
349	QPRDGWPMML	ПлККГШ, РП
350	RPKSTLMNF	РЯ, РП
351	SPYADIIPSA	ПлККГШ
352	LPAFSKIGGIL	КРК, МЕЛ
353	KPRATWTL	ОМЛ, РМЖ, ХГК, ХЛЛ, РЖП, РЖ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, ПКК, МРЛ, РЭМ
354	APAKDARASL	КРК, РЖП, ПлККГШ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РП, КМП
355	APKTSFIAA	РЖ
356	RPFLRLPSL	КРК, ГКК, ПлККГШ, РЯ, РП
357	LPPHIFAI	КРК, РЖ, ГКК, РЭМ
358	APSMRLRKNQL	ГКК
359	SPRRLVELAGQSL	МЕЛ, РЯ, РП, РЭМ
361	SPYGSDRLVQL	ХЛЛ, НХЛ
362	KPMLPPAAF	РЭМ

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептидов при раковых заболеваниях
363	KPRTPFHTA	РЭМ
364	KPRTPFHTAQL	РМЖ, КРК, ГБМ, ГКК, РЭМ
365	RPKHFLQML	РП
366	SPTLRQLDL	ХГК, ГКК
367	APQVHIFSL	РМЖ, КРК, ГБМ, ГКК, РЭМ
368	NPASRLTAL	РМЖ, ХГК, КРК, РЖП, ГБМ, РЖ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, РПрЖ, ПКК, МРЛ, КМП, РЭМ
370	AAHEFGHVL	РМЖ, РЭМ
371	APRSPGQVTPRGL	НМРЛадено, РЯ
372	SPSSASLTL	РЖП, НМРЛплоск, РП
373	LPKPDLPQLI	ОМЛ, РМЖ, ГКК, МЕЛ, НМРЛадено, РПрЖ, ПКК, РЭМ
374	KPRNMTGLDL	ХЛЛ
375	LPRGVLEGL	КРК, НМРЛадено, РЭМ
376	FPQVGR TAL	ОМЛ, РМЖ, ХГК, ХЛЛ, КРК, РЖП, РЖ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, РПрЖ, ПКК, МРЛ, КМП, РЭМ
377	SPFSKRIKL	ОМЛ, РМЖ, ХЛЛ, РЖ, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РП, ПКК, МРЛ, КМП, РЭМ
379	GPRQVLFPL	ОМЛ, РМЖ, ХГК, КРК, РЖП, ГБМ, РЖ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, РПрЖ, ПКК, МРЛ, КМП, РЭМ
380	SPYPGSAAF	РМЖ, НМРЛадено, РП
381	APRPRLLLL	ОМЛ, РМЖ, ХГК, ХЛЛ, КРК, РЖП, ГБМ, РЖ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, РПрЖ, ПКК, МРЛ, КМП, РЭМ
382	RPGPQRTTSV	РМЖ, ХГК, ХЛЛ, ГКК, МЕЛ, НХЛ, РЯ, РП, РПрЖ, МРЛ, РЭМ
383	KPRATWTLKL	РМЖ, ХГК, КРК, РЖП, РЖ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РП, ПКК, МРЛ, РЭМ

Таблица 8б. Сводка данных презентации выбранных опухолеассоциированных пептидов по настоящему изобретению среди различных видов.

ОМЛ: острый миелоидный лейкоз; РМЖ: рак молочной железы; ХГК: холангиоцитная карцинома; ХЛЛ: хронический лимфоцитарный лейкоз; КРК: колоректальный рак; РЖП: рак желчного пузыря; ГБМ: глиобластома; РЖ: рак желудка; ГКК: гепатоклеточная карцинома; ПлККГШ: плоскоклеточная карцинома

головы и шеи; МЕЛ: меланома; НХЛ: неходжкинская лимфома; НМРЛадено: немелкоклеточный рак легких - аденокарцинома; НМРЛдругие: образцы НМРЛ, которые не могут быть однозначно отнесены к НМРЛадено и НМРЛплоск; НМРЛплоск: плоскоклеточный немелкоклеточный рак легких; РЯ: рак яичника; РП: рак пищевода; РПЖ: рак поджелудочной железы; РПрЖ: рак предстательной железы; ПКК: почечноклеточная карцинома; МРЛ: мелкоклеточный рак легких; КМП: карцинома мочевого пузыря; РЭМ: рак эндометрия и матки.

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептидов при раковых заболеваниях
448	TVYGEPRKL	РП
449	RPKTSVNLISL	МРЛ
450	SAAARALLP	ХГК, КРК, ГБМ, РЖ, ГКК, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РПЖ, МРЛ, РЭМ
451	VPILPLNHAL	РЭМ
454	SPDPAHLESL	НМРЛдругие
455	FPVQATIDF	РЯ
456	VPVSHPVLTLL	НМРЛплоск
457	RPPLSQRHTF	НХЛ
459	SPAPWRPWI	МРЛ
460	APLMPLGKTL	РПЖ
461	MPHLGPGILL	МЕЛ
462	MPLLADVRL	МЕЛ
463	LPTDLFNSVM	МЕЛ
467	VPRNQDWLGVSRQL	МЕЛ
468	LPSLHVLVL	МЕЛ
469	LPLDTRTSI	ХЛЛ
470	RPNGEVKSEL	МРЛ
471	LPLLAGTLLL	НМРЛадено
472	LPMPAITWY	МЕЛ
473	LPGEREAAL	МЕЛ
474	VPKADLLTL	МЕЛ
475	IPLEIQKL	МЕЛ
476	EPNPVEEIF	НМРЛплоск
477	NPVPVITWYKDNRL	МЕЛ
478	APKFISPASQL	МРЛ
479	APHAGGALL	НМРЛплоск
480	VPAAPTKAL	ХЛЛ
481	SPARALLLALA	ПлККГШ
482	QPSLKKIIL	РПЖ

484	LPASAEPKGTM	ПлККГШ
485	LPLKTKVFA	НМРЛплоск
486	TPTRPLPSA	НМРЛадено
487	IPWFIKTAF	МЕЛ
488	LPLGGLPLLI	ХЛЛ
489	WPNHIMLVL	МЕЛ
491	MPEADLKRF	МЕЛ
492	IPFSVDEI	НМРЛдругие, РЭМ
493	LPLQQYKLV	ГКК
494	LPLRAVNLNL	МРЛ
495	SPSYTQASL	РМЖ
496	MPAVSGGPLF	НМРЛадено
497	YVVKPLHPF	КРК
498	RPQPQRPAL	ПлККГШ, РП
499	QPVLPSAC	МЕЛ

ПРИМЕР 2:

Определение профиля экспрессии генов, кодирующих пептиды по изобретению

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

Источники и приготовление РНК

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

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

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

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

Эксперименты по секвенированию РНК

Анализ экспрессии гена в образцах РНК опухолевой и нормальной ткани проводили способом секвенирования следующего поколения (RNAseq) лабораторией CeGaT (Тюбинген, Германия). Вкратце, библиотеки секвенирования подготавливали при использовании набора реактивов Illumina HiSeq v4 согласно протоколу производителя (Illumina Inc., Сан-Диего, Калифорния, США), в который входит фрагментация РНК, синтез кДНК и добавление адаптеров секвенирования. Библиотеки, полученные из многочисленных образцов, смешивали в эквимольном соотношении и секвенировали на системе компании Illumina HiSeq 2500 согласно

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

Типичные профили экспрессии исходных генов, предложенных в настоящем изобретении, которые в высокой степени экспрессированы в избытке или исключительно экспрессированы в случае острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоцелочной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия, представлены на Фигурах 2А-2Т. Показатели экспрессии других иллюстративных генов показаны в Таблице 9а и 9б.

Таблица 9а: Показатели экспрессии. 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 (+). Фоновый уровень данного показателя рассчитывали по измерениям следующих соответствующих нормальных тканей: жировая ткань, ткань надпочечника, желчного протока, клетки крови, кровеносные сосуды, костного мозга, головного

мозга, ткань пищевода, глаза, желчного пузыря, сердца, головы и шеи, почки, толстой кишки, печени, легких, лимфатического узла, нерва, паращитовидной железы, поджелудочной железы, гипофиза, плевры, скелетных мышц, кожи, тонкой кишки, селезенки, желудка, щитовидной железы, трахеи, мочеточника, мочевого пузыря. В случае, если в наличии имелись данные для нескольких образцов одного и того же вида ткани, для расчетов использовали среднее арифметическое всех соответствующих образцов. ОМЛ: острый миелоидный лейкоз; РМЖ: рак молочной железы; ХГК: холангиоцитная карцинома; ХЛЛ: хронический лимфоцитарный лейкоз; КРК: колоректальный рак; РЖП: рак желчного пузыря; ГБМ: глиобластома; РЖ: рак желудка; ГКК: гепатоклеточная карцинома; ПлККГШ: плоскоклеточная карцинома головы и шеи; МЕЛ: меланома; НХЛ: неходжкинская лимфома; НМРЛадено: немелкоклеточный рак легких - аденокарцинома; НМРЛдругие: образцы НМРЛ, которые не могут быть однозначно отнесены к НМРЛадено и НМРЛплоск; НМРЛплоск: плоскоклеточный немелкоклеточный рак легких; РЯ: рак яичника; РП: рак пищевода; РПЖ: рак поджелудочной железы; РПрЖ: рак предстательной железы; ПКК: почечноклеточная карцинома; МРЛ: мелкоклеточный рак легких; КМП: карцинома мочевого пузыря; РЭМ: рак эндометрия и матки.

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	в очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
1	RPRSLQCVSL	ХЛЛ		РПрЖ
2	VPGSDPARYEFL	ГКК, РЭМ	РЖП, РЖ, ПлККГШ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РП, МРЛ	МЕЛ, КМП
3	MPYVVLTA	НМРЛплоск, МРЛ	НМРЛадено	ПКК
4	GPKKFIVKL			РПрЖ
5	LPSLSHCSQL	ОМЛ, РМЖ, НХЛ, РП, КМП	РЖП, ПлККГШ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, ПКК, МРЛ	МЕЛ, РЭМ

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	в очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
6	LPLNSSTSL	РМЖ, ГКК, ПКК	ХГК, КРК, РЖ, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, РЯ, РП, РПЖ, КМП, РЭМ	РЖП, НМРЛдругие, НМРЛплоск, МРЛ
7	RPSQLAPATL	ОМЛ, РЖ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, КМП, РЭМ	РЖП	МРЛ
8	MPKTNLSKM	ОМЛ, РЖ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, КМП, РЭМ	РЖП	МРЛ
9	RPDSRLLEL	РЖ, ПлККГШ, НМРЛплоск, РЯ, КМП	ГКК, МЕЛ, МРЛ	РЖП
10	SPMEAELVRRIL	РЖ, ПлККГШ, НМРЛплоск, РЯ, КМП	ГКК, МЕЛ, МРЛ	РЖП
11	APLPRPGAV	РЖ, ПлККГШ, НМРЛплоск, РЯ, КМП	ГКК, МЕЛ, МРЛ	РЖП
12	LPNTGRIGQLL			РПрЖ
13	LPNTGRIGQL			РПрЖ
14	AVHEIGHSL	ГКК, ПКК	ХГК, РЖ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, РЯ, РПЖ, РЭМ	КРК, РЖП, ПлККГШ, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РП, МРЛ, КМП
15	KPGFNISIL	РЯ		РМЖ
16	FPAPPANWF	РЯ		РМЖ
17	SPAAPLSPASSL			КМП
18	MALSVLRLLAL			ОМЛ

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	в очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
19	WPRLPGAGL	РЖ, ГКК, НМРЛплоск, РПЖ, МРЛ, КМП, РЭМ	РЖП, ПлККГШ, РП	МЕЛ
20	MVLGIGPVL			РПрЖ
21	APSRLELEL	ХГК, КРК, РЖП, МЕЛ, МРЛ		ГКК
22	LPQLKPAL	РМЖ, НМРЛплоск	РП	ПлККГШ
23	VPRPTSTVGL		МЕЛ	
24	VPRPTSTVGLFL		МЕЛ	
25	RPQGAVGGL	РЖП	ГКК	
26	SPSFSSTLLSL	РМЖ, РЖП, МРЛ	ГКК, МЕЛ	
27	RIRVTSEVL	ГКК, МЕЛ, РЭМ	РМЖ, РПрЖ	
28	LPAPTSLVL		ГБМ	
29	APLRVHITSL	ГКК	ХГК, НМРЛадено, РЯ	
30	YPGFTKRL	РЖ, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РП, РПЖ, ПКК, МРЛ	РМЖ, ХГК, КРК, РЖП, ГКК, РЯ, КМП	
31	RPGPSDPAA	НМРЛадено, РЭМ	ПКК	
32	APMAPGRSPL	РМЖ	РЭМ	
33	LPRGLSPARQL	РМЖ	РЭМ	
34	APMAPGRSP	РМЖ	РЭМ	
35	APLPPPRAL		ГБМ	
36	RPFSREMDL		ОМЛ	
37	LPPPRALTL		ГБМ	
38	RPSFPNLTSF		ОМЛ	
39	QPRPSSEKI	ОМЛ, ГБМ	МРЛ	
40	FPRTVKHIDAAL	КРК, РЖ, НМРЛадено, РПЖ, КМП	ПлККГШ, НМРЛплоск, РП	
41	MPAGGGPRSL	ХГК, ГКК, НХЛ, РЭМ	ХЛЛ	
42	APLKMLAL		НХЛ	
43	APTPRPKVL	РПрЖ, РЭМ	РМЖ	
44	SPSQTVQRAV		НХЛ	

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	в очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
45	TRPWSGPYIL		МЕЛ	
46	QPISGNPVTL	НХЛ	ХЛЛ	
47	RPRQTGALM		ОМЛ	
48	RPRYSIGL	РПрЖ, РЭМ	РМЖ	
49	APEKARAFL	РЖП, ГКК, ПлККГШ, НМРЛадено, НМРЛдругие, МРЛ, КМП, РЭМ	КРК, РЖ, РПрЖ	
50	PEKARAFL	РЖП, ГКК, ПлККГШ, НМРЛадено, НМРЛдругие, МРЛ, КМП, РЭМ	КРК, РЖ, РПрЖ	
51	SPVFYVQTL	ГКК	РМЖ, РПрЖ	
52	KEDNPSGHTYTL	РМЖ, МЕЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, МРЛ	РЖП, ГКК, НХЛ	
53	SPRIPFSTF		МЕЛ	
54	VPSCGRSVEGL	ХГК, НМРЛдругие, КМП	ПлККГШ, НМРЛплоск, РП, ПКК	
55	LPALLRSGL	РЖП, НХЛ, РП	ХГК	
56	LPALLRSGLTL	РЖП, НХЛ, РП	ХГК	
57	APLLPIRTL		КМП	
58	APLLPIRTLPL		КМП	
59	KPRTIYSSL	ПлККГШ, НМРЛплоск	МРЛ, РЭМ	
60	RPYSIYPHGVTF	ХГК	ГКК	
61	LPRIPFSTF		МЕЛ	
62	KPQSTISGL	ХГК	ГКК	
63	FPHMATTAF	НМРЛдругие, РП	ПлККГШ	
64	VPRPIFSQLYL	ГКК, РЯ, МРЛ, РЭМ	РМЖ, РПрЖ	
65	FPNVYSTLVL	ГКК	МЕЛ	
66	LPMTVISVL	РПЖ, РЭМ	РЖ	
67	VPVSRPVL	НХЛ	ХЛЛ	
68	FPNEVSVVL	НМРЛадено	МЕЛ	
69	RPEDGRPRL	МРЛ	ГБМ	
70	VPAQRLGLL	НМРЛдругие	ХЛЛ	

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	в очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
71	APFAPLHGGGSL		РПрЖ	
72	APCNGNVAV	РМЖ, РЖП, МЕЛ, РЯ	НМРЛадено, КМП	
73	LPVSSPRTL		ГБМ	
74	VPVSHRVL		ХЛЛ, НХЛ	
75	HVRPQTNCI	ГКК, НМРЛдругие, НМРЛплоск, МРЛ	ГБМ	
76	KPKVESQAL	РПрЖ	РМЖ	
77	QRLVPGETL		МЕЛ	
78	HPSQESRTL	МРЛ	РЭМ	
79	GPASDHPSL	РМЖ, ГКК, РЯ, РЭМ	РПрЖ	
80	SALPTTISF	РМЖ, КРК, РЖ, РЭМ	ГКК, НМРЛадено	РЖП, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛплоск, РЯ, РП, МРЛ, КМП
81	IAYPSLREAAL	РМЖ, КРК, РЖ, РЭМ	ГКК, НМРЛадено	РЖП, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛплоск, РЯ, РП, МРЛ, КМП
82	DAAHGPSV		РЯ	РЭМ
83	AVSSHNNVI	РМЖ, РЖП, ГКК, НХЛ, РЯ, МРЛ, КМП		РПрЖ
84	MPMQDIKMI	ОМЛ, РМЖ, РЖ, НХЛ, РП, КМП	РЖП, ПлККГШ, НМРЛадено, НМРЛплоск, ПКК	МЕЛ, РЯ, МРЛ, РЭМ
85	MPMQDIKMILKM	ОМЛ, РМЖ, РЖ, НХЛ, РП, КМП	РЖП, ПлККГШ, НМРЛадено, НМРЛплоск, ПКК	МЕЛ, РЯ, МРЛ, РЭМ
86	ALLLRGVTL	НМРЛплоск, МРЛ	НМРЛадено	ПКК

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	в очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
87	APVGGNVTSSF	ОМЛ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, РП	РЖП, НХЛ	НМРЛплоск, РЯ
88	KPSAVKDSIY	РЯ	РПрЖ, МРЛ	РЭМ
89	FLIPRAGWLAGL			РПрЖ
90	HAIEKAFQL	КРК, МЕЛ, НМРЛадено, РПЖ	РЖ, НМРЛплоск, РП, КМП	ПлККГШ
91	FPRLVGPdff	ГКК, РЯ	РМЖ, ХГК, КРК, РЖП, РЖ, ПлККГШ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РП, РПЖ, КМП, РЭМ	
92	TSPLPPTV		ПКК	
93	SVAIAHGvf	КРК	МРЛ	
94	LPMSKRQEY	РМЖ, КРК, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, КМП	МРЛ, РЭМ	
95	RTKEEINEL	ПлККГШ, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РПЖ, МРЛ	РМЖ, РЖП, МЕЛ, НМРЛадено, РЯ, КМП	
96	QPSLVQAIF	МЕЛ	ОМЛ	
97	LPPGTQIQI	МРЛ	ГБМ	
98	FPCSALLACF	РМЖ	ПКК	
99	MPVSAFTVI	КРК, НМРЛплоск, РЯ, КМП, РЭМ	РМЖ, ХГК, РЖП, РЖ, ПлККГШ, НМРЛадено, РП, РПЖ	
100	TRIPFDKILY	КРК, НМРЛплоск, РЯ, КМП, РЭМ	РМЖ, ХГК, РЖП, РЖ, ПлККГШ, НМРЛадено, РП, РПЖ	
101	KPGLPGLK	КРК, НМРЛплоск, РЯ, КМП, РЭМ	РМЖ, ХГК, РЖП, РЖ,	

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	в очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
			ПлККГШ, НМРЛадено, РП, РПЖ	
102	MAGPAИHTAPM	МРЛ	ГБМ	
103	REPIMKADML	РМЖ, МЕЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, МРЛ	РЖП, ГКК, НХЛ	
104	RPLPNSVIHV		ГКК	
105	RPRYETGVCA	КРК, РЖ, РПЖ	ПлККГШ, МЕЛ, РЯ, РП, КМП	
106	APFHIDRLF	НМРЛплоск, РПЖ, РЭМ	РЖ	
107	GQRLESPGGAA	ГБМ	МРЛ	
108	APRGSPPI	НХЛ	ХЛЛ	
109	LPRALMRST		НХЛ	
110	YPSSPASAV		ГКК	
111	YPLQQTNVY	ГБМ	ПКК	
112	YPSPLNKHSF	ГБМ	ПКК	
113	KPHLDRRGAVI		РЖП, ГКК	
114	FVPPSGPSNPM		МЕЛ	
115	KTKSLAQQQL	РЖП, РЖ, НМРЛадено, НМРЛдругие, РПЖ	ХГК, ПлККГШ, НМРЛплоск, РП, КМП	
116	RSYQHSLRL	РЖП, РЖ, НМРЛадено, НМРЛдругие, РПЖ	ХГК, ПлККГШ, НМРЛплоск, РП, КМП	
117	IPHQRSSL	РПРЖ	ОМЛ	
118	NPERHKPSF		ОМЛ, РЯ, ПКК, РЭМ	
119	KATEYVHSL	ГБМ, МЕЛ, РЯ, МРЛ, КМП	ОМЛ, РЭМ	
120	TVRPKNAAL	ГБМ, МЕЛ, РЯ, МРЛ, КМП	ОМЛ, РЭМ	
121	GPFQRAAL		РЭМ	
122	KPRTPFТТАQLL		РЭМ	
123	RPRLRDLPAL	РЖП, НХЛ, РП	ХГК	

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	в очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
124	KTIDGHINL	ОМЛ, РМЖ, ХГК, КРК, РЖП, ГБМ, РЖ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, КМП, РЭМ	ХЛЛ, НХЛ, МРЛ	
125	SPAQFNIY	ОМЛ, РМЖ, ХГК, КРК, РЖП, ГБМ, РЖ, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, КМП, РЭМ	ХЛЛ, МРЛ	
126	MPREDAHF		МЕЛ	
127	KSKQVITLL		МЕЛ	
128	SPPATLFLFLL	ХГК	МЕЛ	
129	MTLPATTLTL		НХЛ	
130	GAYDKARYL	ГКК, РПрЖ	РМЖ	
131	MPFRNIRSIL	РМЖ, РЯ, МРЛ	ХГК, ГКК	
132	LPRLPVGSLV	РМЖ, КРК, РЖП, РЖ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РЭМ	ПлККГШ, НМРЛадено, РП, РПЖ	
133	LPELPTTLTF	РМЖ, КРК, РЖП, РЖ, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛплоск, РЯ, РЭМ	НМРЛадено, РП, РПЖ	
134	VAAAARLTL		МЕЛ	
135	MPRLLRSL	РЖП, ГКК, НХЛ, РЯ, МРЛ, РЭМ	РМЖ	
136	QPDHAGIFRVF	НМРЛдругие, РП	ПлККГШ	
137	SPQLSYFEY	РЖ, НМРЛадено, НМРЛдругие, РПЖ, КМП	ХГК, ПлККГШ, НМРЛплоск, РП	
138	VPFNLITEY	ГКК	МЕЛ	
139	LVILQHQM	РПЖ, РЭМ	РЖ	
140	TRFPDIHWF	НМРЛадено	МЕЛ	
141	YGPYGSWSGW	НХЛ	ПлККГШ, МЕЛ	

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	в очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
142	HPFKMKWQY	РП	ПКК	
143	YPMIPPAQL	МРЛ	ГБМ	
144	RPVQGIPTY		МЕЛ	
145	VPAQRLGLLL	НМРЛ другие	ХЛЛ	
146	SPTRGSEF		ГБМ	
147	HVAQPAVVL	НХЛ	ХЛЛ	
148	KPHLIYRQ	РМЖ, РЯ, РЭМ	МРЛ	
149	SPSSVFTSK		РМЖ	
150	APLHGGGSL		РПрЖ	
151	QPTWNTQTRL	НХЛ	ХЛЛ	
152	SSASFSELFRH		ГБМ	
153	QPVHSLCSA		РЖ, РПЖ	
154	RPPPSRRAVL		ГБМ	
155	APIPRLIEG	ГКК, РП	ПлККГШ	
156	GSRPVTGSV	РМЖ, РЖП, МЕЛ, РЯ	НМРЛадено, КМП	
157	RPVTGSVC	РМЖ, РЖП, МЕЛ, РЯ	НМРЛадено, КМП	
158	SVPVATVEL		НХЛ	
159	TPMTVPRI	НХЛ	ХЛЛ	
160	IPVSHPVLTF		ХЛЛ, НХЛ	
161	ASKILETSL		МЕЛ	
162	IPIRVDQNGAF	ОМЛ, ГБМ	ХЛЛ	
163	FRYPNGVSL		ГКК	
164	RAAGRRLQL		ГКК	
165	RPSKEMQVTI	ХГК, РЖ	РПЖ	
166	YAYTSRVIL	ОМЛ	ХЛЛ, НХЛ	
167	NVNPARKGL	РЯ, РП	ОМЛ	
168	SPSGQRDVSL		МЕЛ	
169	RPFSVSSISQL		МЕЛ	
170	APEGKRLGF		МЕЛ	
171	LPLGGHKSL		МЕЛ	
172	SAQSLHPVL		ГБМ	
173	VIINNPISL		МЕЛ	
174	IPVTSSVTL		МЕЛ	

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	в очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
175	AAFPHKIIF		ПКК	
176	QPLDICHSF	ХГК, РЖП, РЖ, ГКК, ПлККГШ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, КМП	КРК, МЕЛ	
177	VWEPQGSSRSL		РЭМ	
178	VPYYPRANL	КРК, РЖ, ПлККГШ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РП, КМП	РЖП	
179	PRVRLLLL	ОМЛ	МРЛ	
180	RLRDYISSL	НХЛ	ХЛЛ	
181	LPVSPARAL	ХГК, КРК, РЖП, ГБМ, РЖ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РПЖ, КМП, РЭМ	РМЖ, ПлККГШ, РП	
182	RPLPVSPARAL	ХГК, КРК, РЖП, ГБМ, РЖ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РПЖ, КМП, РЭМ	РМЖ, ПлККГШ, РП	
183	VPRRPARAL		ГБМ	
184	KIIASGNHL	РМЖ, ХЛЛ, НХЛ, ПКК	КМП	
185	RPVLTASSF	НХЛ	ХЛЛ	
186	VPLPAGGGTVLT		МРЛ	
187	APPPPPPPF	ОМЛ, ХЛЛ, НХЛ	РПрЖ	
188	HAAASFETL	МЕЛ	ХЛЛ, НХЛ	
189	QPQCSTHIL		ГКК	
190	RLAHVRARL	РМЖ, ГКК, РЯ	РПрЖ	
191	KPKAVKPKAA	ХЛЛ	НХЛ	
192	IPFADVKSF	НМРЛплоск	НМРЛадено, НМРЛдругие	
193	LPALKEEAF		РПрЖ	

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	в очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
194	HPNKIKASL		РМЖ	
195	NPIFGRKEL		РЭМ	
196	RPSGTAGAAL		ГБМ	
197	RPSGTAGAALLA		ГБМ	
198	LPSPAHAFRAL	ГКК, МЕЛ, НХЛ, РЯ, РПЖ, РЭМ	КМП	
199	SPFWIHQA		ОМЛ	
200	EPFHLIVSY	МЕЛ	ХЛЛ, НХЛ	
201	LPIARVLTV		РМЖ	
202	SPSREASAL		ОМЛ	
203	KPRGPIDI	МЕЛ	РПрЖ	
204	FPYSGDKILV		ГБМ	
205	LPPALLTTV		ГБМ	
206	TPRIGPKVSL		ГБМ	
207	VPSDITTAFF		ГБМ	
208	RNRQVATAL	ОМЛ	ХГК	
209	KIEQIRAVL	ХГК, РЖП, РЖ, ПлККГШ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РПЖ, КМП	РП	
210	IPENRVVSY		КРК	
211	IPDTIASVL		МЕЛ	
212	VPYAAQAAL	КРК, РЖП, МРЛ, РЭМ	ГКК	
213	RPYQDAPVA	НХЛ, ПКК	ГБМ	
214	LPLKFFPII	ХГК, РЖП, РЖ, ГКК, НМРЛадено, РПЖ, МРЛ	РЯ	
215	IPVAIKEL		ГБМ	
216	LPWEQNEQV		ГКК	
217	SPGDKRLAAYL		ГКК	
218	VQRTPPPI	ХГК, КРК, РЖП, РЖ, РПЖ	ПКК, МРЛ	
219	VPHTGRYTCL		МЕЛ	

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	в очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
220	RPAPGPAPFV	РЖП, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛадено, РП, РПЖ, КМП, РЭМ	КРК, РЖ	
221	LPQRPNARL	ХГК, РЖП, РЖ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РПЖ, КМП	ПлККГШ, РП	
222	MLKTTLTAF		ГКК	
223	KAHVRIEL	ГКК	КРК	
224	SPIIHSILL	РМЖ, ПлККГШ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РЭМ	МРЛ	
225	SPIIHSIL	РМЖ, ПлККГШ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РЭМ	МРЛ	
226	APGGSSRSSL		ОМЛ	
227	RPGTGQGGL		ОМЛ	
228	RPTAASQSRAL		ОМЛ	
229	FPNAGPRHLL	НХЛ	ХЛЛ	
230	DVIDDIISL		МЕЛ	
231	SPITLQAL		ГКК	
232	TAYPSLRL	ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛплоск	МРЛ	
233	MAYDRFIAI	РМЖ, РЖП, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РПЖ, МРЛ	НХЛ	
234	HPRAPGEEQRL	ГКК	КРК	
235	AQNPAGTAL		МЕЛ	
236	TPELKSSIL		ГКК	
237	LPRAGGAF	ХГК, РЖ, ПлККГШ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РПЖ, КМП	РП	

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	в очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
238	LPRAGGAFLM	ХГК, РЖ, ПлККГШ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РПЖ, КМП	РП	
239	VLPRAGGAFLM	ХГК, РЖ, ПлККГШ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РПЖ, КМП	РП	
240	RVMLPKAAL	РМЖ, ХГК, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РП, МРЛ, КМП, РЭМ	РЖП	
241	LPKAALLV	РМЖ, ХГК, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РП, МРЛ, КМП, РЭМ	РЖП	
242	IPETASVVAI	МЕЛ	ХЛЛ, НХЛ	
243	MARTGGMVVI		КМП	
244	VPAHLVAA		ПКК	
245	GPVPSPLAL		ХЛЛ	
246	RPILKEQSSSF		ПлККГШ	
247	SPVGVGQRL	ГБМ	МРЛ	
248	KPYDGIPAS		ГБМ	
249	SPRSGVLL	РЯ	РЭМ	
250	APAAPAAVPS	КРК, ГБМ, РЖ, ПлККГШ, МРЛ	НМРЛадено, НМРЛплоск	
251	MPVDSFNMS	ХГК, РЖП, НМРЛадено, РЭМ	КРК	
252	QPENSLEGISL	ХГК, РЖП, НМРЛадено, НМРЛдругие, РПЖ, ПКК, РЭМ	КРК	
253	MPVDSFNMSML	ХГК, РЖП, НМРЛадено, РЭМ	КРК	
254	RVIQGTTL	НХЛ	ХЛЛ	
255	VPSHWMVAL	ХЛЛ	НХЛ	
256	SPVPSHWMVAL	ХЛЛ	НХЛ	

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	в очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
257	APYGTLRKS		ХГК	
258	SVIGPNSRL	НХЛ	ХЛЛ	
259	VPMPGVQAV	КРК	РЭМ	
260	LVQSSRSEV	РП	ПлККГШ	
261	SPSTSRTPL		ГБМ	
262	SPSTSRTPLLSSL		ГБМ	
263	SQRPPATSQA	РЯ	НХЛ	
264	APRPGNWIL	МЕЛ, НМРЛплоск, РЯ, ПКК, МРЛ	РЭМ	
265	FPRKPYEGRV		МЕЛ	
266	KPYEGRVEI		МЕЛ	
267	MPVPGILL		МЕЛ	
268	EPLSVTASY	РЖП, МРЛ	ГКК	
269	FTVSSSSAM		РПЖ	
270	SPRGTTSTL		РПЖ	
271	SPTPVFTTL		РПЖ	
272	SSPRGTTSTL		РПЖ	
273	TDTPSTTPTTI		РПЖ	
274	KPIRTGISPLAL		ГКК	
275	IPAPQGAVL		НМРЛдругие	
276	RPVWDVRSA	НМРЛадено	ПлККГШ	
277	MPPLLIVAF	КМП	РМЖ	
278	LIAARGSLVL	ГБМ, ГКК, МЕЛ, РЯ	МРЛ	
279	APADEPRTVL	РМЖ, ХГК, КРК, РЖП, РЖ, ПлККГШ, НХЛ, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, РПрЖ, МРЛ, КМП, РЭМ	ГБМ	
280	LPRAFLQSL	РМЖ, ХГК, КРК, РЖП, РЖ, ПлККГШ, НХЛ, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, РПрЖ, МРЛ, КМП, РЭМ	ГБМ	
281	NPRSPPATM	ГКК, РЭМ	КМП	

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	в очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
282	AVRLPTPNL	ОМЛ		
283	RPQPGWRESL	РЖП, МРЛ		
284	RPSAPRGPP	КРК		
285	RITWKGLLL	ХГК		
286	APARPAAAF	МЕЛ, РЯ		
287	SPIPRPLFL	РМЖ, МРЛ		
288	LHAMNSLSAM	ХГК, РЯ, МРЛ, КМП, РЭМ		
289	LPYEKVSRL	ХГК		
290	RPTHPLRSF	ГБМ		
291	SPSKSLEM	ХЛЛ, КРК		
292	LPMTHRLQL	ХГК		
293	FPYDKPLIM	ХГК, РЖП, НМРЛадено		
294	VPKPAIPSSSVL	ГБМ, НМРЛплоск, МРЛ		
295	HPRWIEPTVM	РПрЖ		
296	SPLLMQRTL	ОМЛ, ХЛЛ		
297	FPIKYVNDP	ХГК, РЖП, НМРЛадено		
298	RVLLRWISL	ГБМ		
299	SPFSGGPVSF	ПКК		
300	HPYSDLADV	МРЛ		
301	FPAFLEAM	МРЛ		
302	IPIDQILNSF	МРЛ		
303	RPPPPCIAL	МРЛ		
304	SPLIGDFPAF	МРЛ		
305	AASPVGSAL	ГКК		
306	RPFPLALL	КРК		
307	RPHQKGWLSI	ГКК		
308	RPDVVRTLL	ХГК, ПлККГШ, РП		
309	FAFYGGKSL	ГБМ, ГКК, ПлККГШ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РП, МРЛ, КМП		

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	в очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
310	SPGWAQTQL	КРК, РЖ, НМРЛадено, РПЖ, ПКК		
311	APRLALDPDAL	ГБМ, МРЛ, РЭМ		
312	SPSLQSSRESL	РМЖ, ХГК, КРК, РЖП, ГБМ, РЖ, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РП, РПЖ, МРЛ, КМП, РЭМ		
313	VPLSSYVSI	ГБМ		
314	IALMKLAGPL	ХГК, РЖП, РЖ, ГКК, РЯ, РПЖ, МРЛ		
315	APVVPAL	МРЛ		
316	NPREPEKSL	КРК, РЖП, РЖ, РПЖ		
317	MPYNSAHHCVV	ХЛЛ, РЯ		
318	TPISNTGVL	ХЛЛ, НХЛ		
319	RPLDTRVFL	РПрЖ, КМП		
320	APMHIDRNIL	ГКК		
321	QPQQPGFFL	ОМЛ		
322	RAVPVGSGL	МРЛ		
323	TPHGITDIL	РЖ		
324	LPAPLRISL	ГБМ		
325	SPRSNPVRL	НХЛ		
326	IPPFTQRVF	ПлККГШ, НМРЛплоск		
327	GPRTTQSSVL	ХЛЛ, НХЛ		
328	LPLHRGDLVI	ХЛЛ		
329	QPANFIVLL	РЖП, РЖ, РПЖ		
330	RPFSAIAEL	ХГК		
331	SPDSAILKL	РПрЖ		
332	SPYAGSTAF	РМЖ		
333	SVLPRALSL	МРЛ		
334	YPLSLALHF	МРЛ		
335	VPPQNPRPSL	ОМЛ		
336	YPLQGPGLLSV	НМРЛдругие, МРЛ		

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	в очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
337	IPTSRVITL	ГКК, НХЛ		
338	MPATPSLKV	ХГК, КРК		
339	GPQRTTSV	НХЛ		
340	APEPRAALL	МЕЛ		
341	LPRSPPLKVL	РЖП, НХЛ		
342	RPRPPKVL	ГКК, НМРЛдругие, НМРЛплоск		
343	RPRPPKVLGL	ГКК, НМРЛдругие, НМРЛплоск		
344	VPYPSPTCV	ГКК, РПрЖ		
345	SAAPPGASL	ГКК, РПрЖ		
346	IPMPRITWL	КМП		
347	SPEKINSF	МЕЛ, МРЛ		
348	HPAPPV TSA	ПлККГШ, РЯ, РП, КМП		
349	QPRDGWPMML	ПлККГШ, РЯ, РП, КМП		
350	RPKSTLMNF	ПлККГШ, РЯ, РП, КМП		
351	SPYADIIPSA	РМЖ, МЕЛ		
352	LPAFSKIGGIL	МРЛ		
353	KPRATWTL	ПлККГШ, РЯ		
354	APAKDARASL	ГБМ		
355	APKTSFIAA	КРК, РЖ, НМРЛадено, РПЖ		
356	RPFLRLPSL	КРК, ПлККГШ, РП		
357	LPPHIFAI	МЕЛ		
358	APSM LRKNQL	РМЖ, ГБМ, МЕЛ, НМРЛадено, РП, МРЛ	РЖП, КМП	ГКК
359	SPRRLVELAGQSL	ОМЛ, РМЖ, РЖ, ГКК, НХЛ, РП, КМП	РЖП, ПлККГШ, НМРЛадено, НМРЛплоск, ПКК	МЕЛ, РЯ, МРЛ, РЭМ
360	SPASRSISLL	ОМЛ, РЖ, ПлККГШ, РЯ, РП	ХЛЛ, НХЛ	ПКК
361	SPYGSDRLVQL	НХЛ	ХЛЛ	

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	в очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
362	KPMLPPAAF		РЭМ	
363	KPRTPFHTA		РЭМ	
364	KPRTPFHTAQL		РЭМ	
365	RPKHFLQML	ПлККГШ, НХЛ, НМРЛплоск, РП	РЯ	
366	SPTLRQLDL	ГКК	НХЛ	
367	APQVHIFSL	ГБМ, РЯ	ХГК	
368	NPASRLTAL	РПрЖ, РЭМ	РМЖ	
369	RPYGCVLRAA	ОМЛ, ХГК, РЖП, РЖ, ПлККГШ, РЯ, РП	ХЛЛ, НХЛ	ПКК
370	AAHEFGHVL	ГКК, НМРЛдругие, РЯ, ПКК, МРЛ	РМЖ, ХГК, КРК, РЖП, РЖ, ПлККГШ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РП, РПЖ, КМП, РЭМ	
371	APRSPGQVTPRGL	ГКК, НМРЛадено, НМРЛплоск, РПЖ, МРЛ	КРК, РЖП, РЖ, ПКК	
372	SPSSASLTL	РЖП, РЖ, ГКК, МЕЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, РПЖ, РЭМ	ПлККГШ, НМРЛплоск, РЯ, РП, МРЛ, КМП	
373	LPKPDLPQLI	РМЖ, ГКК	РПрЖ	
374	KPRNMTGLDL	НХЛ	ХЛЛ	
375	LPRGVLEGL	РМЖ, ХГК, КРК, РЖП, РЖ, ПлККГШ, НХЛ, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, РПрЖ, МРЛ, КМП, РЭМ	ГБМ	
376	FPQVGR TAL	ХЛЛ		
377	SPFSKRIKL	ОМЛ, ХЛЛ, НХЛ		
378	SPRQPR LDF	НМРЛплоск, МРЛ		
379	GPRQVLFPL	ГБМ		
380	SPYPGSAAF	РМЖ, РЖ		

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	В очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
381	APRPRLLLL	ХГК, РЖП, МЕЛ		
382	RPGPQRTTSV	НХЛ		
383	KPRATWTLKL	ПлККГШ, РЯ		

Таблица 9б: Показатели экспрессии. В таблице представлены пептиды, полученные из генов, которые в очень высокой степени избыточно экспрессируются в опухолях в сравнении с панелью нормальных тканей (+++), в высокой степени избыточно экспрессируются в опухолях в сравнении с панелью нормальных тканей (++) или избыточно экспрессируются в опухолях в сравнении с панелью нормальных тканей (+). Фоновый уровень данного балла рассчитывали по измерениям следующих соответствующих нормальных тканей: жировая ткань, надпочечник, желчные протоки, клетки крови, кровеносные сосуды, костный мозг, головной мозг, пищевод, глаз, желчный пузырь, сердце, голова и шея, почка, толстая кишка, печень, легкие, лимфатический узел, нерв, парацитовидная железа, поджелудочная железа, гипофиз, плевра, скелетная мышца, кожа, тонкая кишка, селезенка, желудок, щитовидная железа, трахея, мочеточник, мочевого пузыря. В случае, если в наличии имелись данные для нескольких образцов одного и того же вида ткани, для расчетов использовали среднее арифметическое всех соответствующих образцов. РМЖ: рак молочной железы; ХГК: холангиоцитная карцинома; ХЛЛ: хронический лимфоцитарный лейкоз; КРК: колоректальный рак; РЖП: рак желчного пузыря; ГБМ: глиобластома; РЖ: рак желудка; ГКК: гепатоклеточная карцинома; ПлККГШ: плоскоклеточная карцинома головы и шеи; МЕЛ: меланома; НХЛ: неходжкинская лимфома; НМРЛадено: немелкоклеточный рак легких - аденокарцинома; НМРЛплоск: плоскоклеточный немелкоклеточный рак легких; РЯ: рак яичника; РП: рак пищевода; РПЖ: рак поджелудочной железы; РПрЖ: рак предстательной железы; ПКК: почечно-клеточная карцинома; МРЛ:

мелкоклеточный рак легких; КМП: карцинома мочевого пузыря; РЭМ: рак эндометрия и матки.

Seq ID No	Последовательность	Экспрессия гена в опухолевых образцах		
		избыточная экспрессия (+)	в высокой степени избыточная экспрессия (++)	в очень высокой степени избыточная экспрессия (+++)
448	TVYGEPRKL	РМЖ, КРК, РЖ, РЭМ	ГКК, НМРЛадено	РЖП, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛплоск, РЯ, РП, МРЛ, КМП
449	RPKTSVNLISL	ГКК, НХЛ, ПКК	ХГК, РЖП, РЖ, МЕЛ, НМРЛадено, РЯ, РП, РПЖ, КМП, РЭМ	КРК, ПлККГШ, НМРЛдругие, НМРЛплоск, МРЛ
450	SAAARALLP	ГКК, МЕЛ, ПКК, МРЛ	РМЖ, КРК, РЖП, РЖ, ПлККГШ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, РП, КМП, РЭМ	ХГК, РПЖ
451	VPILPLNHAL	РМЖ	РЭМ	
452	QPVKKNTL	ГКК, РЭМ	ПКК	
453	APALPGQVTI	ХГК, КРК, РЖП, ГКК, МЕЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РПЖ, РПРЖ	РМЖ, ГБМ, РЯ, МРЛ, КМП, РЭМ	
454	SPDPAHLESL	РМЖ, РЖ, НМРЛадено, РП, РПЖ, РЭМ	РЖП, ГКК, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛплоск, РЯ, МРЛ, КМП	
455	FPVQATIDF	РМЖ, КРК, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, КМП	МРЛ, РЭМ	
456	VPVSHPVLT		ХЛЛ, НХЛ	

457	RPPLSQRHTF	НХЛ	ХЛЛ	
458	VPIPTHYFVVL		ПКК	
459	SPAPWRPWI	РМЖ, НМРЛплоск, РЯ, РПрЖ, КМП, РЭМ	МРЛ	
460	APLMPLGKTL	РЖП, РЖ, НМРЛадено, НМРЛдругие, РПЖ, РЭМ	ХГК, ПлККГШ, НМРЛплоск, РП, КМП	
461	MPHLGPGILL		МЕЛ	
462	MPLLADVRL		МЕЛ	
463	LPTDLFNSVM		МЕЛ	
464	VPFVPRTSV	РМЖ, РЖ, ПлККГШ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РП, РПЖ, ПКК, КМП, РЭМ	ХГК, КРК, РЖП	
465	VPKSLPYVL	ПлККГШ, НМРЛплоск, РП	ОМЛ, ГКК, НХЛ	
466	SPMEAILVSRL	КРК, НМРЛадено, НМРЛплоск, МРЛ	ПКК	
467	VPRNQDWLGVSRQ L		МЕЛ	
468	LPSLHVLVL		МЕЛ	
469	LPLDTRTSI	НХЛ	ХЛЛ	
470	RPNGEVKSEL	ПКК, МРЛ	КРК	
471	LPLLAGTLLL		РЭМ	
472	LPMPAITWY		МЕЛ	
473	LPGEREAAL		МЕЛ	
474	VPKADLLTL		МЕЛ	
475	IPLEIQKL		ГКК	
476	EPNPVEEIF	ХГК, КРК, ГБМ, РЖ, ПлККГШ, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РП	РМЖ, РЖП, МЕЛ, НМРЛадено, РПЖ	
477	NPVPVITWYKDNRL		МЕЛ	
478	APKFISPASQL	ПКК, МРЛ	КРК	
479	APHAGGALL	РЖП, ПлККГШ, МЕЛ, НМРЛадено, НМРЛплоск, РЯ, МРЛ, РЭМ	НХЛ	

480	VPAAPTKAL	КМП	ГБМ	
481	SPARALLLALA	ХГК, КРК, РЖП, ГБМ, РЖ, МЕЛ, НХЛ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РПЖ, КМП, РЭМ	РМЖ, ПлККГШ, РП	
482	QPSLKKIIL	ХГК, ХЛЛ, РЖП, РЖ, ГКК, НМРЛплоск, РПЖ	НМРЛадено, РЭМ	
483	KPAAAGVKKVA	ХЛЛ	НХЛ	
484	LPASAEPKGTМ	ХГК, КРК, РЖП, РЖ, ГКК, ПлККГШ, НМРЛадено, НМРЛдругие, НМРЛплоск, РЯ, РПЖ	РП, КМП	
485	LPLKTKVFA	ХГК, НМРЛадено, НМРЛдругие, РПЖ, ПКК	РМЖ	
486	TPTRPLPSA	ХГК, КРК, РЖП, РЖ, РПЖ	ПКК, МРЛ	
487	IPWFIKTAF		МЕЛ	
488	LPLGGLPLLI	НХЛ	ХЛЛ	
489	WPNHIMLVL	РМЖ, МЕЛ, РЯ	РПрЖ	
490	APRGPAQGEAA		ОМЛ	
491	MPEADLKRIF		МЕЛ	
492	IPFSVDEI	ХГК, РЖП, НМРЛадено, РЭМ	КРК	
493	LPLQQYKLV	КРК, ГБМ, РЖ, ПлККГШ, НМРЛплоск, МРЛ	НМРЛадено	
494	LPLRAVNLNL	РЖП, ГБМ, МЕЛ, НМРЛплоск, РЯ, РП	МРЛ	
495	SPSYTQASL		РМЖ	
496	MPAVSGPGPLF		РПрЖ	
497	YVVKPLHPF	НМРЛдругие, НМРЛплоск	НМРЛадено	
498	RPQPQRPAL	ХЛЛ, НХЛ, РЯ, РП, КМП	ХГК, РЖП, ПлККГШ	
499	QPVLPSAC		МЕЛ	

ПРИМЕР 3:

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

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

Прайминг CD8+ Т-клеток *in vitro*

В целях проведения стимуляций *in vitro* искусственными антигенпрезентирующими клетками, нагруженными комплексом пептид-МНС (pMHC) и антителом к CD28, заявители сначала выделили CD8+ Т-клетки из свежего продукта лейкофереза HLA-B*07 методом позитивной селекции с помощью микросфер CD8 (Miltenyi Biotec, Бергиш-Гладбах, Германия). Кровь была получена от здоровых доноров (после подписания формы информированного согласия) из Университетской клиники г. Мангейм, Германия.

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

Получение микросфер, покрытых pMHC и антителами к CD28, стимуляции Т-клеток и считывание производили на хорошо исследованной системе *in vitro*, используя

четыре различные молекулы рМНС для каждого цикла стимуляций и 8 различных молекул рМНС для каждого цикла считывания.

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

рМНС, использованные для положительных и отрицательных контрольных стимуляций, были A*0201/MLA-001 (пептид ELAGIGILTV (SEQ ID NO. 446) из модифицированного Melan-A/MART-1) и A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI из DDX5, SEQ ID NO. 447), соответственно.

800 000 микросфер / 200 мкл вносили в лунки 96-луночного планшета в присутствии 4 x 12,5 нг другого биотинилированного комплекса рМНС, промывали и затем добавляли 600 нг биотинилированных антител к CD28 в объеме 200 мкл. Стимуляцию проводили в 96-луночных планшетах путем совместной инкубации 1×10^6 CD8+ Т-клеток с 2×10^5 промытых покрытых микросфер в 200 мкл среды TCM с добавлением 5 нг/мл ИЛ-12 (PromoCell) в течение 3 дней при 37°C. Половина среды была затем заменена на свежую среду TCM с добавлением 80 Ед/мл ИЛ-2, и инкубация была продолжена в течение четырех 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 пятью различными флуорохромами. Наконец, проводили анализ мультимеров посредством окрашивания клеток набором для определения жизнеспособности клеток при воздействии ближнего ИК-излучения с красителем Live/dead (Invitrogen, Карлсруэ, Германия), клоном SK1 антител CD8-FITC (BD, Гейдельберг, Германия)

и мультимерами рМНС с флуоресцентными метками. Для анализа использовали цитометр BD LSRII SORP, снабженный подходящими лазерами и фильтрами. Пептид-специфические клетки были подсчитаны как процентная доля от всех CD8+ клеток. Оценку результатов анализа мультимеров проводили с помощью программы FlowJo (Tree Star, Орегон, США). Прайминг *in vitro* специфических мультимер-положительных CD8+ лимфоцитов оценивали сравнением со стимуляциями отрицательного контроля. Иммуногенность для заданного антигена была определена, если было обнаружено, что по меньшей мере в одной подлежащей оценке простимулированной *in vitro* лунке одного здорового донора содержалась специфическая CD8+ Т-клеточная линия после стимуляции *in vitro* (т. е. когда данная лунка содержала по меньшей мере 1% специфичных мультимер-положительных среди CD8-положительных Т-клеток и процентная доля специфичных мультимер-положительных клеток была по меньшей мере в 10 раз выше медианного значения стимуляций отрицательного контроля).

Иммуногенность *in vitro* пептидов острого миелоидного лейкоза, рака молочной железы, холангиоцелочной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака желчного пузыря, глиобластомы, рака желудка, гепатоклеточной карциномы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, меланомы, неходжкинской лимфомы, рака легких (в том числе немелкоклеточного рака легких-аденокарциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), рака яичника, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы мочевого пузыря, рака матки и эндометрия.

Для проанализированных пептидов, связанных с молекулами HLA I класса, иммуногенность *in vitro* могла быть продемонстрирована генерированием пептид-специфических Т-клеточных линий. Типичные результаты проточного цитометрического анализа после TUMAP-специфического окрашивания мультимеров для двух пептидов по изобретению показаны на Фиг. 3А – 3Г вместе

с соответствующими отрицательными контролями. Результаты для 58 пептидов по изобретению обобщаются в Таблицах 10а и 10б.

Таблица 10а: Иммуногенность *in vitro* пептидов HLA I класса по изобретению
 Типичные результаты экспериментов по иммуногенности *in vitro*, проведенных заявителем для пептидов по изобретению.

<20 % = +; 20 % - 49 % = ++; 50 % - 69 % = +++ ; >= 70 % = ++++

Seq ID No	Последовательность	Положительные лунки [%]
388	SPSVSQLSVL	++++
389	APLPRPGAVL	++
390	SPRMSGLLSQT	+++
391	APRPASSL	+
392	GPQPWHAAL	++
393	APAAWLRSA	+++
396	VPDVAQFVL	++
398	SPASRSISL	+
399	NPFYPEVEL	+
405	LPFDGPGGIL	++++
406	LPDGSRVEL	++++
407	FPRLVGPDL	+++
408	YPKDIYSSF	++
410	SPRSWIQVQI	+
411	IPNWARQDL	++++
414	KPSESIYSAL	++
415	LPSDSHFKITF	++
418	RPMTPTQIGPSL	+
419	SPMWHVQQL	++++
420	SPRWLPVSL	++++
423	SPRVYWLGL	++++
425	YPRGNHWAVGHL	++
427	VPSSRILQL	+++
429	RPRALRDLQL	++
430	RPRALRDLQLL	+++
433	IPEPSAQQQL	+
437	FPYPYAERL	+++
440	YPRTITPGM	+
443	VPDGVSKVL	+++
445	RPAATAVISL	+

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

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

Seq ID No	Последовательность	Положительные лунки [%]
1	RPRSLQCVSL	+
3	MPYVVLTAI	+
4	GPKKFIVKL	+
5	LPSLSHCSQL	++
6	LPLNSSTSL	+
9	RPDSRLLEL	+++
12	LPNTGRIGQLL	++
17	SPAAPLSPASSL	+
21	APSRLEL	+
23	VPRPTSTVGL	++
24	VPRPTSTVGLFL	+
26	SPSFSSTLLSL	+
33	LPRGLSPARQL	++
38	RPSFPNLTSF	+
45	TRPWSGPYIL	+
48	RPRYSIGL	+
49	APEKARAFL	+
51	SPVFYVQTL	+
53	SPRIPFSTF	+
56	LPALLRSGLTL	+++
59	KPRTIYSSL	+
61	LPRIPFSTF	++
64	VPRPIFSQLYL	+++
68	FPNEVSVVL	++
361	SPYGSDRLVQL	+
364	KPRTPFTTAQL	+
365	RPKHFLQML	+
366	SPTLRQLDL	++

ПРИМЕР 4:

Синтез пептидов

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

ПРИМЕР 5:

Анализ связывания МНС

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

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

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

Таблица 11: Показатели связывания с молекулами МНС I класса. Связывание рестриктированных по молекулам HLA I класса пептидов с HLA-B*07 распределено по выходу пептидного обмена: >10% = +; >20% = ++; >50 = +++; > 75% = ++++

SEQ ID	Последовательность	Пептидный обмен
1	RPRSLQCVSL	++++
2	VPGSDPARYEF L	+++
3	MPYVVLTA	++++
4	GPKKFIVKL	+++
5	LPSLSHCSQL	++++
6	LPLNSSTSL	++++
7	RPSQLAPATL	+++
8	MPKTNLSKM	+++
9	RPDSRLLEL	++++
10	SPMEAEVRRIL	++++
11	APLPRPGAV	++++
12	LPNTGRIGQLL	++++
13	LPNTGRIGQL	+++
14	AVHEIGHSL	+++
15	KPGFNISIL	++++
16	FPAPPAHWF	++++
17	SPAAPLSPASSL	++++
18	MALSVLRAL	++
19	WPRLPGAGL	+++
20	MVLGIGPVL	++++
21	APSRLEL	++++
22	LPQLKPAL	++++
23	VPRPTSTVGL	+++
24	VPRPTSTVGLFL	++++
25	RPQGAVGGL	+++
26	SPSFSSTLLSL	++++
27	RIRVTSEVL	+++
28	LPAPTSVL	++++
29	APLRVHITSL	++++
30	YPGFTKRL	+++
31	RPGPSDPAA	+++
32	APMAPGRSPL	++++
33	LPRGLSPARQL	+++
34	APMAPGRSP	+++
35	APLPPRAL	+++
36	RPFSREMDL	+++
37	LPPRALTL	+++
38	RPSFPNLTSF	++++
39	QPRPSSEKI	+++
40	FPRTVKHIDAAL	++++
41	MPAGGGPRSL	++++

SEQ ID	Последовательность	Пептидный обмен
42	APLKMLAL	++++
43	APTPRPKVL	++++
44	SPSQTVQRAV	++++
45	TRPWSGPYIL	+++
46	QPISGNPVTL	+++
47	RPRQTGALM	++++
48	RPRYSIGL	+++
49	APEKARAFL	+++
50	PEKARAFL	+++
51	SPVFYVQTL	++++
52	KEDNPSGHTYT L	+++
53	SPRIPFSTF	++++
54	VPSCGRSVEGL	+++
56	LPALLRSGTL	++++
59	KPRTIYSSL	++++
60	RPYSIYPHGVTF	++++
61	LPRIPFSTF	++++
62	KPQSTISGL	+++
63	FPHMATTAF	+++
64	VPRPIFSQLYL	++++
65	FPNVYSTLVL	++++
66	LPMTVISVL	++++
67	VPVSRPVL	++++
68	FPNEVSVVL	++++
69	RPEDGRPRL	+++
70	VPAQRLGLL	++++
71	APFAPLHGGGS L	+++
72	APCNGNVAV	+++
73	LPVSSPVTL	++++
74	VPVSHPVL	++++
75	HVRPQTNCI	+++
76	KPKVESQAL	++++
77	QPRLVPGETL	++++
78	HPSQESPTL	+++
79	GPASDHPSL	+++
80	SALPTTISF	+++
81	IAYPSLREAAL	++
83	AVSSHNI	++
84	MPMQDIKMI	+++

SEQ ID	Последовательность	Пептидный обмен
85	MPMQDIKMILK M	+++
86	ALLLRGVTL	++
87	APVGGNVTSF	+++
88	KPSAVKDSIY	++
89	FLIPRAGWLAGL	++
91	FPRLVGPdff	++++
92	TSPLPPTV	+++
93	SVAIAHGvf	++++
94	LPMSKRQEY	+++
95	RTKEEINEL	++
96	QPSLVQAIF	++++
98	FPCSALLACF	++++
99	MPVSAFTVI	++++
101	KGPLPGLK	+
102	MAGPAIHTAPM	++
103	REPIMKADML	++
104	RPLPNSVIHV	+++
105	RPRYETGVCA	++++
106	APFHIDRLF	+++
108	APRGSPPI	+++
109	LPRALMRST	+++
110	YPSSPASAV	++++
111	YPLQQTNVY	+
112	YPSPLNKHSF	+++
113	KPHLDRRGAVI	++++
114	FVPPSGPSNPM	++
115	KTKSLAQQL	+++
117	IPHQRSSL	++++
118	NPERHKPSF	+++
119	KATEYVHSL	+
120	TVRPKNAAL	+++
121	GPFQRAAL	+++
122	KPRTPFTTAQLL	++++
123	RPRLRDLPAL	+++
125	SPAKQFNIY	++
126	MPREDAHF	+
127	KSKQVITLL	+
129	MTLPATTLTL	++
130	GAYDKARYL	++
131	MPFRNIRSIL	+++
132	LPRLPVGSLV	++++

SEQ ID	Последовательность	Пептидный обмен
133	LPELPTTLTF	++
134	VAAAARLTL	+++
135	MPRLRLSL	+++
136	QPDHAGIFRVF	++++
139	LVILQHQAM	+++
140	TPFPDIHWF	++++
141	YGPYGSWSGW	++
143	YPMIPPAQL	+++
144	RPVQGIPTY	+++
145	VPAQRLGLLL	+++
146	SPTRGSEF	++++
147	HVAQPAVVL	+++
149	SPSSVFTSK	+++
150	APLHGGGSL	+++
151	QPTWNTQTRL	++++
152	SSASFSELFRH	+++
153	QPVHSLCSA	++++
154	RPPPSRRAVL	+++
156	GSRPVTGSV	+++
157	RPVTGSVC	++++
158	SVPVATVEL	++
160	IPVSHPVLTf	++
161	ASKILETSL	++
162	IPIRVDQNGAF	+++
164	RAAGRRLQL	++++
165	RPSKEMQVTI	++++
167	NVNPARKGL	++++
168	SPSGQRDVSL	++++
169	RPFSVSSISQL	++++
170	APEGKRLGF	++++
171	LPLGGHKSL	+++
172	SAQSLHPVL	+++
173	VIINNPISL	++
174	IPVTSSVTL	++++
176	QLDICHSF	++++
177	VWEPQGSSRSL	+++
178	VPYYPRANL	+++
180	RLRDYISSL	++++
181	LPVSPARAL	+++
182	RPLPVSPARAL	+++
183	VPRRPARAL	+++
184	KIIASGNHL	++

SEQ ID	Последовательность	Пептидный обмен
185	RPVLTASSF	++++
186	VPLPAGGGTVL T	+
187	APPPPPPPF	++++
188	HAAASFETL	++
189	QPQCSTHIL	++++
190	RLAHVRARL	+++
191	KPKAVKPKAA	++++
192	IPFADVKSF	++
193	LPALKEEAF	++++
194	HPNKIKASL	+++
195	NPIFGRKEL	+++
196	RPSGTAGAAL	+++
197	RPSGTAGAALL A	++
198	LPSPAHAFRAL	+++
199	SPFWIHQA	++
201	LPIARVLTV	++++
202	SPSREASAL	+++
203	KPRGPIDI	++
204	FPYSGDKILV	+++
206	TPRIGPKVSL	+++
207	VPSDITTAFF	+++
208	RNRQVATAL	+++
209	KIEQIRAVL	+++
210	IPENRVVSY	++
211	IPDTIASVL	+++
212	VPYAAQAAL	++++
213	RPYQDAPVA	++++
214	LPLKFFPII	+
215	IPVAIKEL	++
216	LPWEQNEQV	+++
217	SPGDKRLAAYL	+++
219	VPHTGRYTCL	+++
220	RPAPGPAPFV	+++
221	LPQRPNARL	+++
222	MLKTTLTAF	+
223	KAHVRIEL	++
224	SPIIHSILL	++++
225	SPIIHSIL	+++
226	APGGSSRSSL	+++
227	RPGTGQGGL	+++

SEQ ID	Последовательность	Пептидный обмен
228	RPTAASQSRAL	+++
229	FPNAGPRHLL	+++
230	DVIDDIISL	++++
231	SPITLQAL	++++
232	TAYPSLRL	+++
233	MAYDRFIAI	+++
234	HPRAPGGEQQRL	+++
235	AQNPAGTAL	+
236	TPELKSSIL	+++
237	LPRAGGAF	++++
238	LPRAGGAFLM	++++
239	VLPRAGGAFLM	+++
240	RVMLPKAAL	+++
242	IPETASVVAI	+++
243	MARTGGMVVI	++
244	VPAHLVAA	++
245	GPVPSPLAL	++++
246	RPILKEQSSSSSF	++++
247	SPVGVGQRL	+++
248	KPYDGIPAS	+++
249	SPRSGVLL	+++
250	APAAPAAVPS	++
251	MPVDSFNSM	++++
252	QPENSLEGISL	+++
253	MPVDSFNSML	++++
254	RVIQGTITL	++++
255	VPSHWMVAL	++++
256	SPVPSHWMVAL	++++
258	SVIGPNSRL	++
259	VPMPGVQAV	++++
260	LVQSSRSEV	++++
261	SPSTSRTPPL	+++
262	SPSTSRTPPLSS L	++++
263	SQRPPATSQA	++
264	APRPGNWIL	+++
265	FPRKPYEGRV	+++
266	KPYEGRVEI	++++
267	MPVPGILL	+++
268	EPLSVTASY	++
269	FTVSSSSAM	++
270	SPRGTTSTL	+++

SEQ ID	Последовательность	Пептидный обмен
271	SPTPVFTTL	+++
272	SSPRGTTSTL	+++
273	TDTPSTTPTTI	++
274	KPIRTGISPLAL	+++
275	IPAPQGAVL	+++
276	RPVWDVRSA	++++
277	MPPLLIVAF	++
278	LIAARGSLVL	+++
279	APADEPRTVL	+++
280	LPRAFLQSL	++++
281	NPRSPATM	++++
282	AVRLPTPNL	++++
283	RPQPGWRESL	++++
284	RPSAPRGPP	++++
285	RITWKGLLL	+++
286	APARPAAAF	++++
287	SPIPRPLFL	++++
288	LHAMNSLSAM	+++
289	LPYEKVSRL	+++
290	RPTHPLRSF	++++
291	SPSKSLEM	+++
292	LPMT SRLQL	+++
293	FPYDKPLIM	++++
294	VPKPAIPSSSVL	++++
295	HPRWIEPTVM	++++
296	SPLLMQRTL	++++
298	RVLLRWISL	+++
299	SPFSGGPVSF	++++
300	HPYSDLADVF	+++
301	FPAFLEAM	+++
302	IPIDQILNSF	+++
303	RPPPPCIAL	++++
304	SPLIGDFPAF	++
305	AASPVGSAL	+++
306	RPFPLALL	+++
307	RPHQKGWLSI	+++
308	RPDVVRTLL	++++
309	FAFYGGKSL	+++
310	SPGWAQTQL	++++
311	APRLALDPDAL	++++
312	SPSLQSSRESL	+++
313	VPLSSYVSI	++++

SEQ ID	Последовательность	Пептидный обмен
314	IALMKLAGPL	++
315	APVVFPAL	++++
316	NPPEPEKSL	+++
317	MPYNSAHHCVV	++++
318	TPISNTGVL	++++
319	RPLDTFRVL	++++
320	APMHIDRNIL	++++
321	QPQQPGFFL	+++
322	RAVPVGSGL	+++
323	TPHGITDIL	++++
324	LPAPLRISL	++++
325	SPRSNPVRL	++++
327	GPRTTQSSVL	++++
328	LPLHRGDLVI	+++
329	QPANFIVLL	+++
330	RPFSAIAEL	++++
331	SPDSAILKL	+++
332	SPYAGSTAF	++++
333	SVLPRALSL	+++
334	YPLSLALHF	++++
335	VPPQNPRPSL	+++
336	YPLQGPGLLSV	+++
337	IPTSRVITL	++++
338	MPATPSLKV	+++
339	GPQRTTSV	+++
340	APEPRAALL	+++
341	LPRSPPLKVL	++++
342	RPRPPKVL	+++
343	RPRPPKVLGL	+++
344	VPYPSPTCV	++++
345	SAAPPGASL	+++
346	IPMPRITWL	++++
347	SPLKINSF	++++
348	HPAPPV TSA	+++
349	QPRDGWPMML	++++
350	RPKSTLMNF	++++
351	SPYADIIPSA	+++
352	LPAFSKIGGIL	++++
353	KPRATWTL	+++
354	APAKDARASL	++++
355	APKTSFIAA	++++
356	RPFLRLPSL	+++

SEQ ID	Последовательность	Пептидный обмен
357	LPPHIFAI	++
358	APSMRLRKNQL	+++
359	SPRRLVELAGQSL	++++
360	SPASRSISLL	++++
361	SPYGSDRLVQL	++++
362	KPMLPPAAF	+++
363	KPRTPFHTTA	++++
364	KPRTPFHTTAQL	++++
365	RPKHFLQML	++++
366	SPTLRQLDL	++++
367	APQVHIFSL	++++
368	NPASRLTAL	++++
369	RPYGCVLRAA	++++
370	AAHEFGHVL	++
371	APRSPGQVTPRGL	+++
372	SPSSASLTL	++++
373	LPKPDLPQLI	+
374	KPRNMTGLDL	++++
375	LPRGVLEGL	++++
376	FPQVGRTAL	++++
377	SPFSKRIKL	+++
378	SPRQPRLDF	++++
379	GPRQVLFPL	++++
380	SPYPGSAAF	++++
381	APRPRLLLL	+++
382	RPGPQRRTTSV	++++
383	KPRATWTLKL	+++
448	TVYGEPRKL	++
449	RPKTSVNLISL	++++
450	SAAARALLP	+
451	VPILPLNHAL	++++
452	QPVKKNTL	++++
453	APALPGQVTI	++++
454	SPDPAHLESL	++++
455	FPVQATIDF	++++
456	VPVSHPVLT	+++
457	RPPLSQRHTF	++++
458	VPIPTHYFVVL	++++
459	SPAPWRPWI	++++
460	APLMPLGKTL	++++

SEQ ID	Последовательность	Пептидный обмен
461	MPHLGPGILL	++++
462	MPLLADVRL	++++
463	LPTDLFNSVM	++++
464	VPFVPRTSV	+++
465	VPKSLPYVL	++++
466	SPMEAILVSRL	++++
467	VPRNQDWLGVSRQL	++++
468	LPSLHVLVL	++++
469	LPLDTRTSI	++++
470	RPNGEVKSEL	++++
471	LPLLAGTLLL	++
472	LPMPAITWY	++
473	LPGEREAL	++++
474	VPKADLLTL	++++
475	IPLIQKL	+
476	EPNPVEEIF	++
477	NPVPVITWYKDNRL	++++
478	APKFISPASQL	++++
479	APHAGGALL	++++
480	VPAAPTAL	+++
481	SPARALLALA	+++
482	QPSLKKIIL	++++
483	KPAAAGVKKVA	+++
484	LPASAEPKGTML	++
486	TPTRPLPSA	++
487	IPWFIKTAF	++++
488	LPLGGLPLLI	+++
489	WPNHIMLVL	++++
490	APRGPAQGEAA	++++
491	MPEADLKRIF	++
492	IPFSVDEI	+
493	LPLQQYKLV	+
494	LPLRAVNLNL	+++
495	SPSYTQASL	++++
496	MPAVSGPGPLF	+++
497	YVVKPLHPF	+++
498	RPQPQPRPAL	++++
499	QPVLPSPAC	++++

Список цитируемой литературы

- Alcoser, S. Y. et al., BMC Biotechnol. **11** (2011): 124
Allison, J. P. et al., Science. **270** (1995): 932-933
Andersen, R. S. et al., Nat Protoc. **7** (2012): 891-902
Anderson, N. L. et al., J Proteome Res. **11** (2012): 1868-1878
Appay, V. et al., Eur J Immunol. **36** (2006): 1805-1814
Banchereau, J. et al., Cell. **106** (2001): 271-274
Beatty, G. et al., J Immunol. **166** (2001): 2276-2282
Beggs, J. D., Nature. **275** (1978): 104-109
Benjamini, Y. et al., Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological),. **Vol.57** (1995): 289-300
Boulter, J. M. et al., Protein Eng. **16** (2003): 707-711
Braumuller, H. et al., Nature.(2013)
Bray, F. et al., Int J Cancer. **132** (2013): 1133-1145
Brossart, P. et al., Blood. **90** (1997): 1594-1599
Bruckdorfer, T. et al., Curr Pharm Biotechnol. **5** (2004): 29-43
Card, K. F. et al., Cancer Immunol Immunother. **53** (2004): 345-357
Cohen, C. J. et al., J Mol Recognit. **16** (2003a): 324-332
Cohen, C. J. et al., J Immunol. **170** (2003b): 4349-4361
Cohen, S. N. et al., Proc Natl Acad Sci U S A. **69** (1972): 2110-2114
Coligan, J. E. et al., Current Protocols in Protein Science.(1995)
Colombetti, S. et al., J Immunol. **176** (2006): 2730-2738
Dengjel, J. et al., Clin Cancer Res. **12** (2006): 4163-4170
Denkberg, G. et al., J Immunol. **171** (2003): 2197-2207
Falk, K. et al., Nature. **351** (1991): 290-296
Ferlay et al., GLOBOCAN 2012 v1 0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No 11 [Internet] (2013), <http://globocan.iarc.fr>
Follenzi, A. et al., Nat Genet. **25** (2000): 217-222
Fong, L. et al., Proc Natl Acad Sci U S A. **98** (2001): 8809-8814
Forsey, R. W. et al., Biotechnol Lett. **31** (2009): 819-823
Gabrilovich, D. I. et al., Nat Med. **2** (1996): 1096-1103
Gattinoni, L. et al., Nat Rev Immunol. **6** (2006): 383-393
Gnjatic, S. et al., Proc Natl Acad Sci U S A. **100** (2003): 8862-8867
Godkin, A. et al., Int Immunol. **9** (1997): 905-911
Gragert, L. et al., Hum Immunol. **74** (2013): 1313-1320
Green, M. R. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual. **4th** (2012)
Greenfield, E. A., Antibodies: A Laboratory Manual. **2nd** (2014)
Gunawardana, C. et al., Br J Haematol. **142** (2008): 606-609
Gustafsson, C. et al., Trends Biotechnol. **22** (2004): 346-353
Hwang, M. L. et al., J Immunol. **179** (2007): 5829-5838
Jung, G. et al., Proc Natl Acad Sci U S A. **84** (1987): 4611-4615
Kibbe, A. H., Handbook of Pharmaceutical Excipients. **rd** (2000)
Krieg, A. M., Nat Rev Drug Discov. **5** (2006): 471-484
Kuball, J. et al., Blood. **109** (2007): 2331-2338

- Liddy, N. et al., *Nat Med.* **18** (2012): 980-987
Ljunggren, H. G. et al., *J Exp Med.* **162** (1985): 1745-1759
Longenecker, B. M. et al., *Ann N Y Acad Sci.* **690** (1993): 276-291
Lonsdale, J., *Nat Genet.* **45** (2013): 580-585
Lukas, T. J. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* **78** (1981): 2791-2795
Lundblad, R. L., *Chemical Reagents for Protein Modification.* **3rd** (2004)
Meziere, C. et al., *J Immunol.* **159** (1997): 3230-3237
Molina, J. R. et al., *Mayo Clin Proc.* **83** (2008): 584-594
Morgan, R. A. et al., *Science.* **314** (2006): 126-129
Mortara, L. et al., *Clin Cancer Res.* **12** (2006): 3435-3443
Mueller, L. N. et al., *J Proteome Res.* **7** (2008): 51-61
Mueller, L. N. et al., *Proteomics.* **7** (2007): 3470-3480
Mumberg, D. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96** (1999): 8633-8638
Pinheiro, J. et al., *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models* (<http://CRANR-project.org/package=nlme>) (2015)
Plebanski, M. et al., *Eur J Immunol.* **25** (1995): 1783-1787
Porta, C. et al., *Virology.* **202** (1994): 949-955
Rammensee, H. et al., *Immunogenetics.* **50** (1999): 213-219
Rini, B. I. et al., *Cancer.* **107** (2006): 67-74
Rock, K. L. et al., *Science.* **249** (1990): 918-921
Rodenko, B. et al., *Nat Protoc.* **1** (2006): 1120-1132
Saiki, R. K. et al., *Science.* **239** (1988): 487-491
Schmitt, T. M. et al., *Hum Gene Ther.* **20** (2009): 1240-1248
Scholten, K. B. et al., *Clin Immunol.* **119** (2006): 135-145
Seeger, F. H. et al., *Immunogenetics.* **49** (1999): 571-576
Sherman, F. et al., *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics.* (1986)
Silva, L. P. et al., *Anal Chem.* **85** (2013): 9536-9542
Singh-Jasuja, H. et al., *Cancer Immunol Immunother.* **53** (2004): 187-195
Small, E. J. et al., *J Clin Oncol.* **24** (2006): 3089-3094
Sturm, M. et al., *BMC Bioinformatics.* **9** (2008): 163
Teufel, R. et al., *Cell Mol Life Sci.* **62** (2005): 1755-1762
Thakkar, J. P. et al., *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **23** (2014): 1985-1996
Tran, T. T. et al., *Photochem Photobiol.* **90** (2014): 1136-1143
Walter, S. et al., *J Immunol.* **171** (2003): 4974-4978
Walter, S. et al., *Nat Med.* **18** (2012): 1254-1261
Willcox, B. E. et al., *Protein Sci.* **8** (1999): 2418-2423
World Cancer Report (2014)
Zaremba, S. et al., *Cancer Res.* **57** (1997): 4570-4577
Zufferey, R. et al., *J Virol.* **73** (1999): 2886-2892

Формула изобретения

1. Пептид, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы последовательностей, состоящей из SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 383 и с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 499 и варианты последовательности, которые по меньшей мере на 88% гомологичны последовательностям с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 383 и с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 499, и где указанный вариант связывается с молекулой(ами) главного комплекса гистосовместимости МНС и/или индуцирует перекрестную реакцию Т-клеток с указанным вариантным пептидом; и его фармацевтически приемлемая соль, где длина указанного пептида составляет вплоть до 16 аминокислот.
2. Пептид в соответствии с п. 1, где указанный пептид имеет способность связываться с молекулой МНС I или II класса, и где указанный пептид, когда он связан с указанной молекулой МНС, в состоянии распознаваться Т-клетками CD4 и/или CD8.
3. Пептид или его вариант в соответствии с п. 1 или п. 2, где его аминокислотная последовательность включает непрерывный фрагмент аминокислот в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 2383 и с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 499.
4. Пептид или его вариант в соответствии с любым из пп. 1–3, где указанный пептид или его вариант имеет общую длину от 8 до 16 аминокислот, и, наиболее предпочтительно, где пептид состоит или состоит по существу из аминокислотной последовательности в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 383 и с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 499.
5. Пептид или его вариант в соответствии с любым из пп. 1–4, где указанный пептид модифицирован и/или включает непептидные связи.

6. Пептид или его вариант в соответствии с любым из пп. 1–5, где указанный пептид является частью слитого белка, в частности, включающим N-терминальные аминокислоты антиген-ассоциированной инвариантной цепи (Ii) HLA-DR.

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

8. Т-клеточный рецептор, предпочтительно растворимый или связанный с мембраной, или его фрагмент, который реагирует с HLA-лигандом, причем указанный лиганд является пептидом или его вариантом в соответствии с любым из пп. 1–5, предпочтительно пептидом или его вариантом в соответствии с любым из пп. 1–5, когда он связан с молекулой МНС.

9. Т-клеточный рецептор в соответствии с п. 8, где указанная аминокислотная последовательность лиганда по меньшей мере на 88% идентична любой из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 383 и с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 499, или где аминокислотная последовательность указанного лиганда состоит из любой из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 383 и с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 499.

10. Т-клеточный рецептор в соответствии с п. 8 или п. 9, где указанный Т-клеточный рецептор представлен в виде растворимой молекулы и, факультативно, обладает дополнительной эффекторной функцией, например, несет иммуностимулирующий домен или токсин.

11. Аптамер, который специфически распознает пептид или его вариант в соответствии с любым из пп. 1–5, предпочтительно пептид или его вариант в соответствии с любым из пп. 1–5, который связан с молекулой МНС.

12. Нуклеиновая кислота, кодирующая пептид или его вариант в соответствии с любым из пп. 1–5, антитело или его фрагмент в соответствии с п. 7, Т-клеточный рецептор или его фрагмент в соответствии с п. 8 или п. 9, факультативно связанная с гетерологичной последовательностью промотора, или вектор экспрессии, экспрессирующий указанную нуклеиновую кислоту.

13. Рекомбинантная клетка-хозяин, включающая пептид в соответствии с любым из пп. 1–6, антитело или его фрагмент в соответствии с п. 7, Т-клеточный рецептор или его фрагмент в соответствии с п. 8 или п. 9 или нуклеиновую кислоту или вектор экспрессии в соответствии с п. 12, где указанная клетка-хозяин предпочтительно является антигенпрезентирующей клеткой, такой как дендритная клетка, Т-клетка или НК-клетка.

14. Способ получения активированных Т-лимфоцитов *in vitro*, где способ включает контактирование Т-клеток *in vitro* с нагруженными антигеном молекулами МНС человека I или II класса, экспрессированными на поверхности подходящей антигенпрезентирующей клетки или искусственной конструкции, имитирующей антигенпрезентирующую клетку, на период времени, достаточного для активации указанных Т-клеток антиген-специфическим образом, где указанный антиген является пептидом в соответствии с любым из пп. 1–4.

15. Активированный Т-лимфоцит, полученный с помощью способа в соответствии с п. 14, который селективно распознает клетку, которая презентует полипептид, включающий аминокислотную последовательность, данную в любом из пп. 1–4.

16. Фармацевтическая композиция, включающая по меньшей мере один активный ингредиент, выбранный из группы, состоящей из пептида в соответствии с любым из пп. 1–6, антитела или его фрагмента в соответствии с п. 7, Т-клеточного рецептора или его фрагмента в соответствии с п. 8 или п. 9, аптамера в соответствии с п. 11, нуклеиновой кислоты или вектора экспрессии в соответствии с п. 12, клетки-хозяина в соответствии с п. 13 или активированного Т-лимфоцита в

соответствии с п. 15 или конъюгированного или меченного активного ингредиента и фармацевтически приемлемого носителя, и факультативно фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ и/или стабилизаторов.

17. Способ получения пептида или его варианта в соответствии с любым из пп. 1–6, антитела или его фрагмента в соответствии с п. 7 или Т-клеточного рецептора или его фрагмента в соответствии с п. 8 или п. 9, причем способ включает культивацию клетки-хозяина в соответствии с п. 13 и выделение пептида или его варианта, антитела или его фрагмента или Т-клеточного рецептора или его фрагмента из указанной клетки-хозяина и/или ее культуральной среды.

18. Пептид в соответствии с любым из пп. 1–6, антитело или его фрагмент в соответствии с п. 7, Т-клеточный рецептор или его фрагмент в соответствии с п. 8 или п. 9, аптамер в соответствии с п. 11, нуклеиновая кислота или вектор экспрессии в соответствии с п. 12, клетка-хозяин в соответствии с п. 13 или активированный Т-лимфоцит в соответствии с п. 15 для применения в медицине.

19. Способ уничтожения клеток-мишеней у пациента, чьи клетки-мишени презентруют полипептид, включающий аминокислотную последовательность, данную в любом из пп. 1–4, где способ включает введение пациенту эффективного числа активированных Т-клеток, как определено в п. 15.

20. Пептид в соответствии с любым из пп. 1–6, антитело или его фрагмент в соответствии с п. 7, Т-клеточный рецептор или его фрагмент в соответствии с п. 8 или п. 9, аптамер в соответствии с п. 11, нуклеиновая кислота или вектор экспрессии в соответствии с п. 12, клетка-хозяин в соответствии с п. 13 или активированный Т-лимфоцит в соответствии с п. 15 для применения в диагностике и/или лечении рака или для применения в производстве медикамента против рака.

21. Применение в соответствии с п. 20, где указанное раковое заболевание выбирается из группы: острый миелоидный лейкоз, рак молочной железы, холангиоцеллюлярная карцинома, хронический лимфоцитарный лейкоз, колоректальный рак, рак желчного пузыря, глиобластома, рак желудка,

гепатоклеточная карцинома, плоскоклеточная карцинома головы и шеи, меланома, неходжкинская лимфома, рак легких (в том числе немелкоклеточный рак легких-аденокарцинома, плоскоклеточный немелкоклеточный рак легких и мелкоклеточный рак легких), рак яичника, рак пищевода, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечно-клеточная карцинома, карцинома мочевого пузыря, рак матки и эндометрия и других опухолей, которые демонстрируют избыточную экспрессию белка, из которого получен пептид с последовательностью с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 383 и с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 499.

22. Комплект, включающий:

(а) контейнер, включающий фармацевтическую композицию, содержащую пептид(ы) или вариант в соответствии с любым из пп. 1–6, антитело или его фрагмент в соответствии с п. 7, Т-клеточный рецептор или его фрагмент в соответствии с п. 8 или п. 9, аптамер в соответствии с п. 11, нуклеиновую кислоту или вектор экспрессии в соответствии с п. 12, клетку-хозяина в соответствии с п. 13 или активированный Т-лимфоцит в соответствии с п. 15 в виде раствора или в лиофилизированной форме;

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

(в) факультативно – по меньшей мере еще один пептид, выбранный из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 445 и с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 499, и

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

23. Комплект в соответствии с п. 22, дополнительно включающий один или более (iii) буферов, (iv) разбавителей, (v) фильтров, (vi) игл или (v) шприцев.

24. Способ получения персонализированной противораковой вакцины или медикаментозной и/или клеточной терапии для отдельного пациента, где указанный способ включает:

- а) идентификацию опухолеассоциированных пептидов (TUMAP), презентруемых опухолевым образцом указанного отдельного пациента;
- б) сравнение пептидов, идентифицированных на этапе а), с хранилищем пептидов, которые предварительно прошли скрининг на иммуногенность и/или избыточную презентацию в опухолях по сравнению с нормальными тканями;
- в) выбор по меньшей мере одного пептида из хранилища, который соответствует пептиду TUMAP, идентифицированному у пациента; и
- г) производство и/или приготовление лекарственной формы персонализированной вакцины или препарата для медикаментозной или клеточной терапии на основании этапа в).

25. Способ в соответствии с п. 24, где указанные пептиды TUMAP идентифицируют с помощью:

- а1) сравнения данных по экспрессии в опухолевом образце с данными образца нормальной ткани, соответствующей типу ткани опухолевого образца, для идентификации белков, которые в опухолевом образце экспрессируются в избытке или абберрантно; и
- а2) установление корреляции между данными экспрессии и последовательностями лигандов МНС, связанных с молекулами МНС I и/или II класса в опухолевом образце, в целях идентификации лигандов МНС, которые получены из белков, избыточно или абберрантно экспрессируемых опухолью.

26. Способ в соответствии с п. 24 или п. 25, где последовательности лигандов МНС идентифицируют с помощью элюирования связанных пептидов из молекул МНС, выделенных из опухолевого образца, и секвенирования элюированных лигандов.

27. Способ в соответствии с любым из пп. 24–26, где нормальную ткань, соответствующую типу ткани опухолевого образца, получают у одного и того же пациента.

28. Способ в соответствии с любым из пп. 24–27, где пептиды, включенные в хранилище, идентифицируют на основании следующих этапов:

аа. Проведение анализа экспрессии информационной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) всего генома с помощью методов с высокой степенью параллелизма, таких как выявление профилей экспрессии на основе микрочипов или секвенирования, включающих идентификацию генов, которые в избытке экспрессируются в злокачественной ткани по сравнению с нормальной тканью или тканями;

аб. Выбор пептидов, которые кодируются генами, экспрессируемыми селективно или в избытке, как было обнаружено на этапе аа, и

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

ба. Идентификация HLA-лигандов из указанного опухолевого образца с помощью масс-спектрометрии;

бб. Проведение анализа экспрессии информационной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) всего генома с помощью методов с высокой степенью параллелизма, таких как выявление профилей экспрессии на основе микрочипов или секвенирования, включающих идентификацию генов, которые в избытке экспрессируются в злокачественной ткани по сравнению с нормальной тканью или тканями;

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

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

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

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

29. Способ в соответствии с любым из пп. 24–28, где иммуногенность пептидов, включенных в хранилище, определяют способом, включающим анализ иммуногенности *in vitro*, контроль иммунного статуса пациента на наличие связывания отдельных пептидов с молекулами HLA, окрашивание МНС-мультимеров, анализ методом ELISPOT и/или внутриклеточное окрашивание цитокинов.

30. Способ в соответствии с любым из пп. 24–29, где указанное хранилище включает множество пептидов, выбранных из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 445 и с SEQ ID NO: 448 по SEQ ID NO: 499.

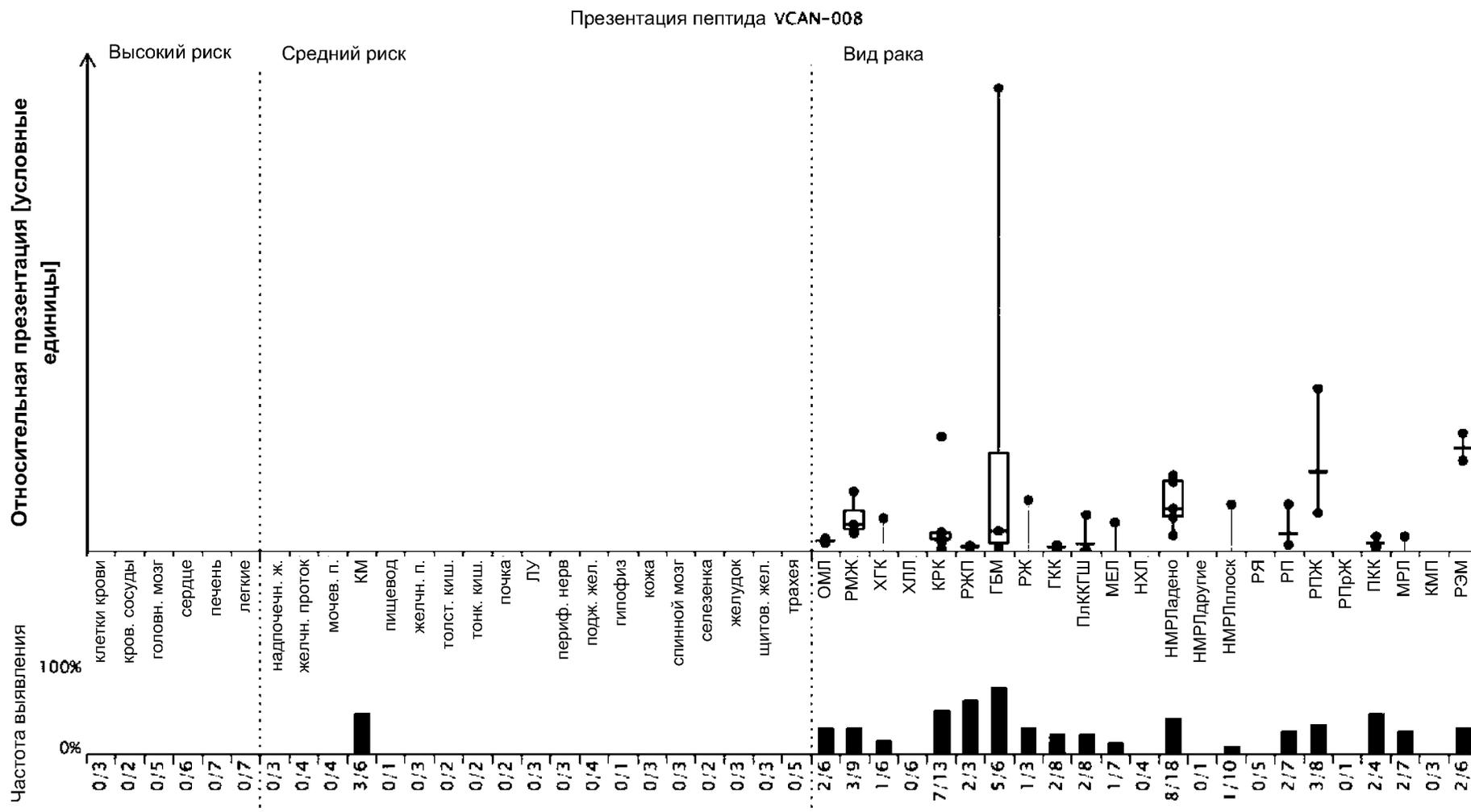
31. Способ в соответствии с любым из пп. 24–30, дополнительно включающий идентификацию по меньшей мере одной мутации, являющейся уникальной для опухолевого образца по сравнению с нормальной соответствующей тканью отдельного пациента, и выбор пептида, который коррелирует с мутацией, для включения в вакцину или получения средств клеточной терапии.

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

Фигура 1А

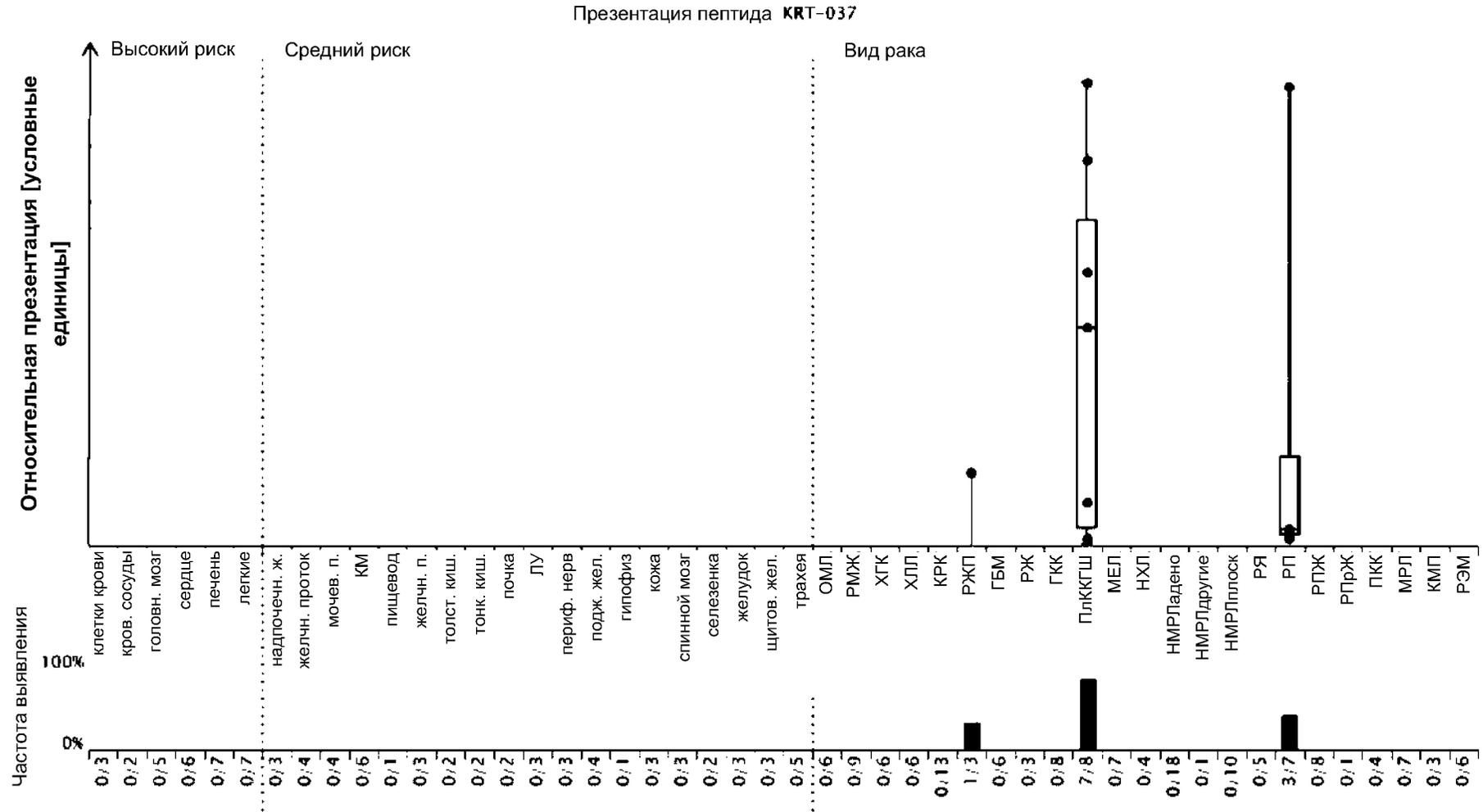
Пептид: TPRIGPKVSL (B*07)

SEQ ID NO: 206



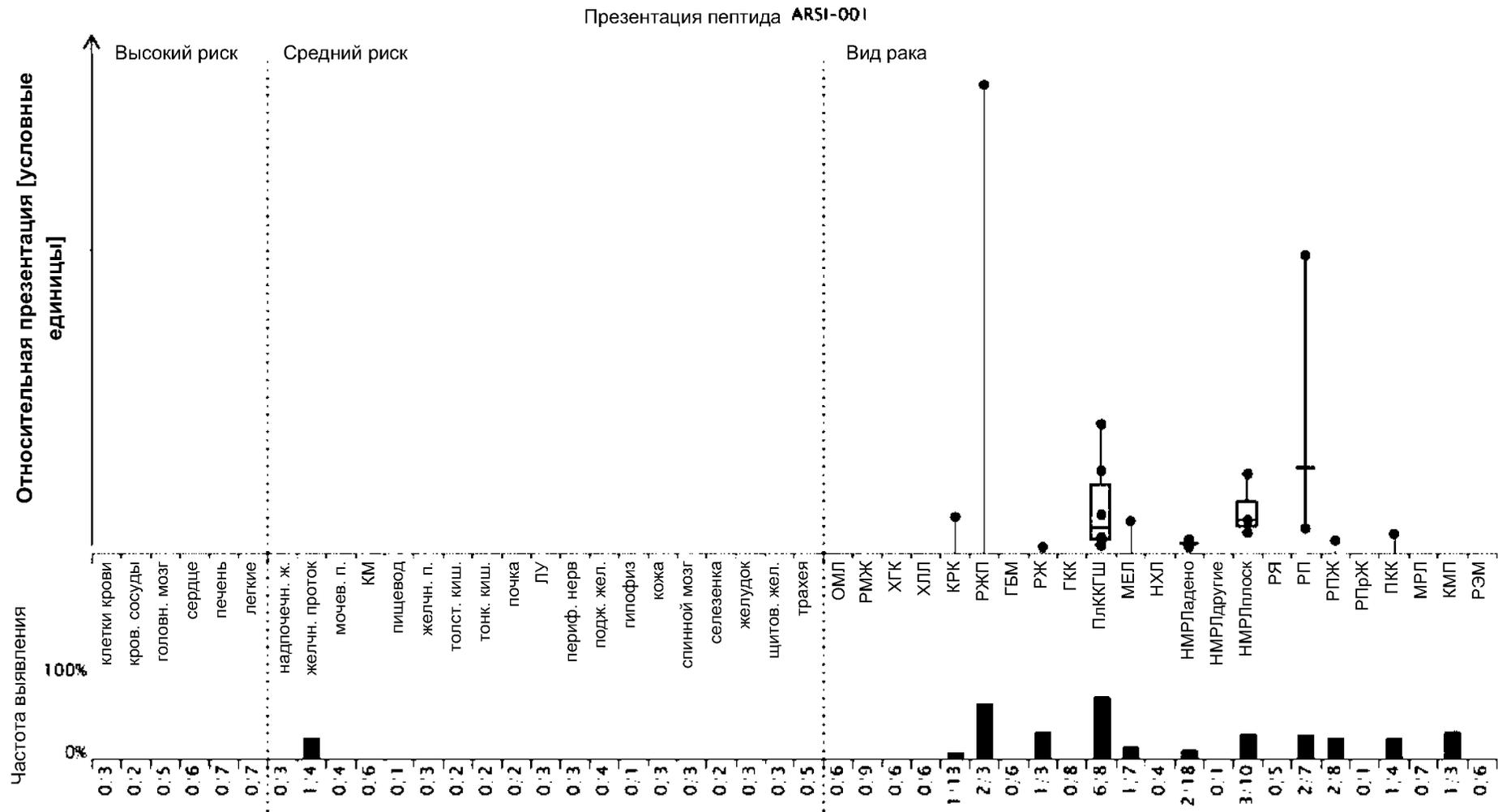
Фигура 1В

Пептид: RPILKEQSSSSF (B*07)
SEQ ID NO: 246



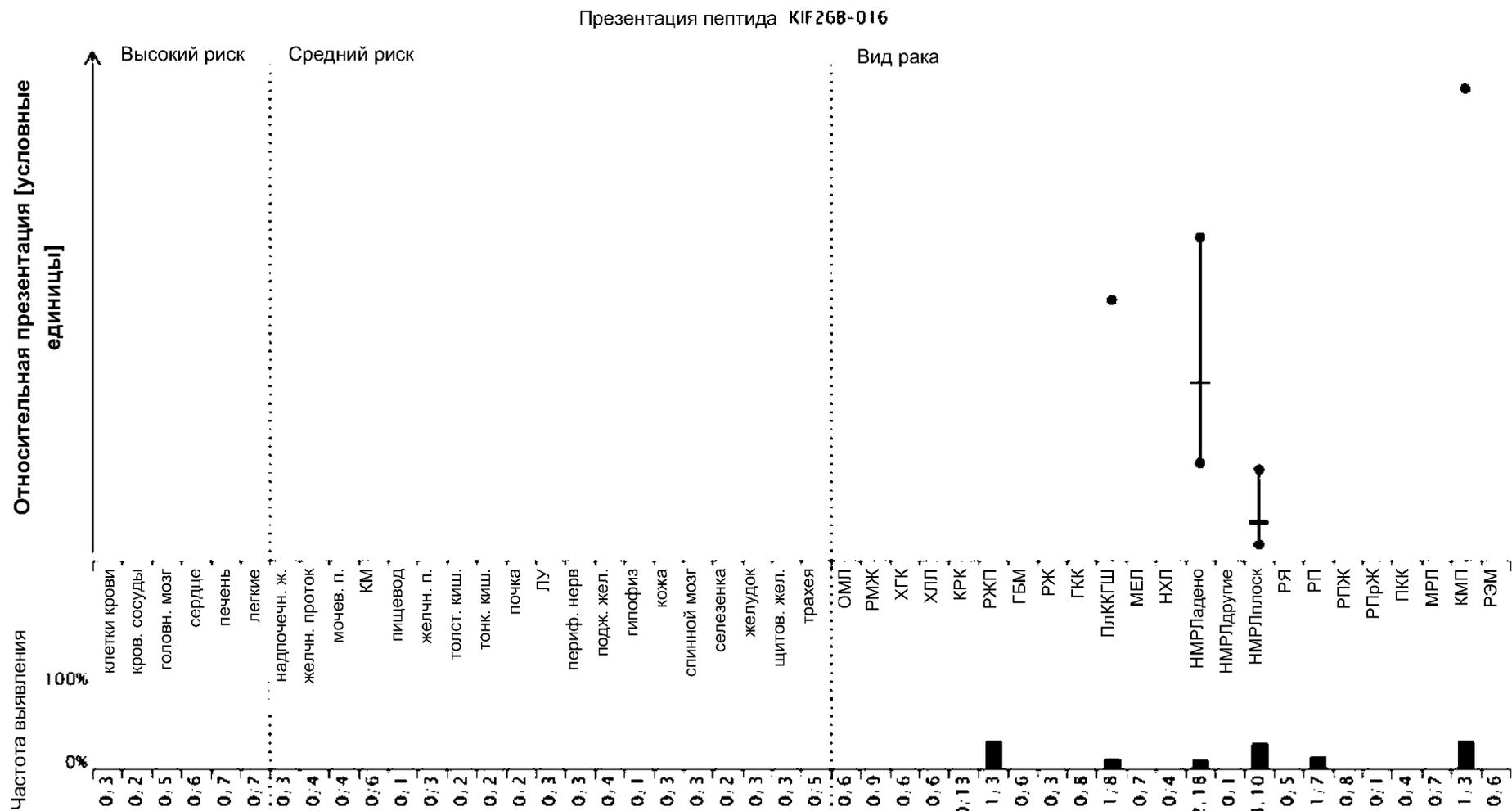
Фигура 1С

Пептид: RPDVVRTLL (B*07)
SEQ ID NO: 308



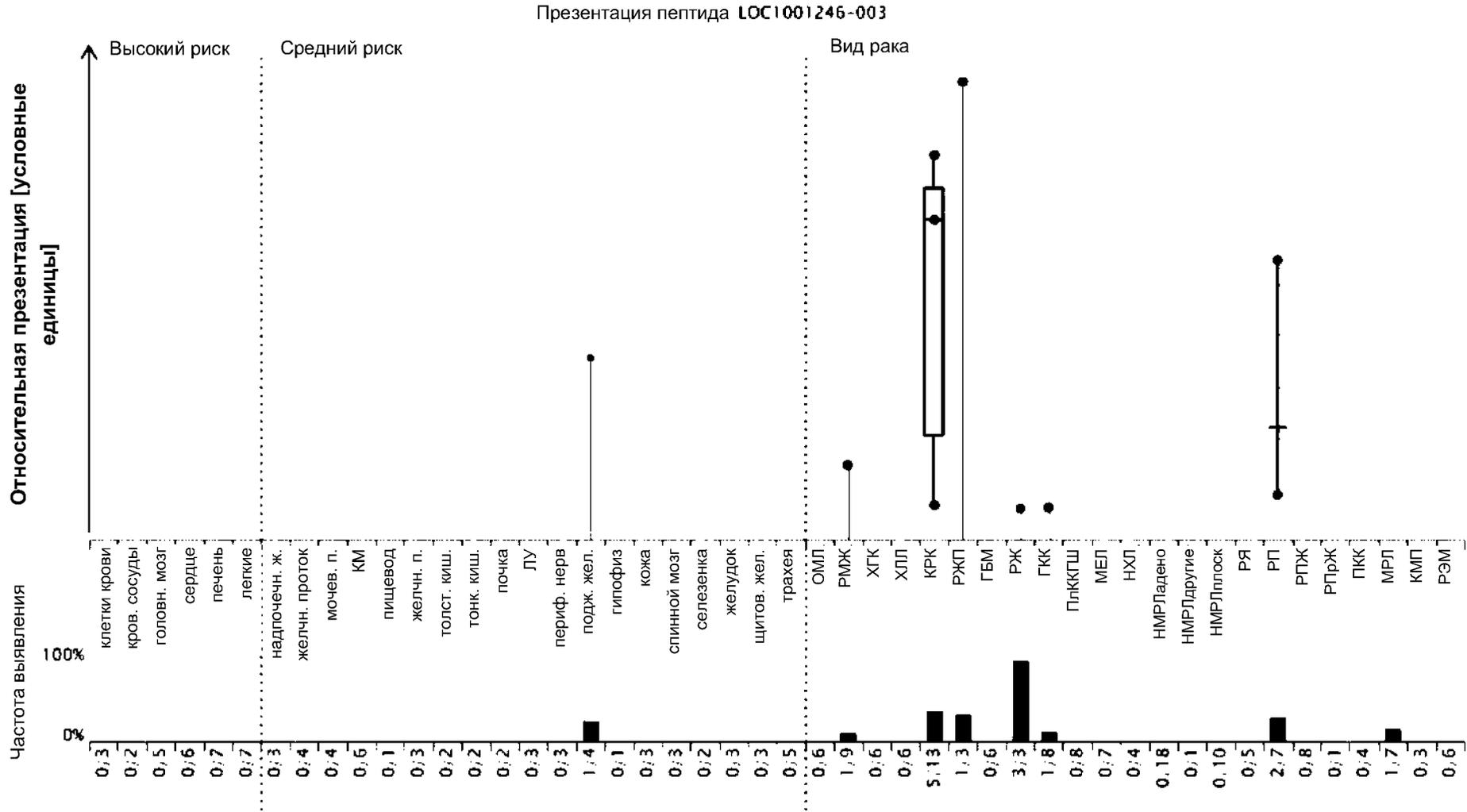
Фигура 1D

Пептид: SPSLQSSRESL (B*07)
SEQ ID NO: 312



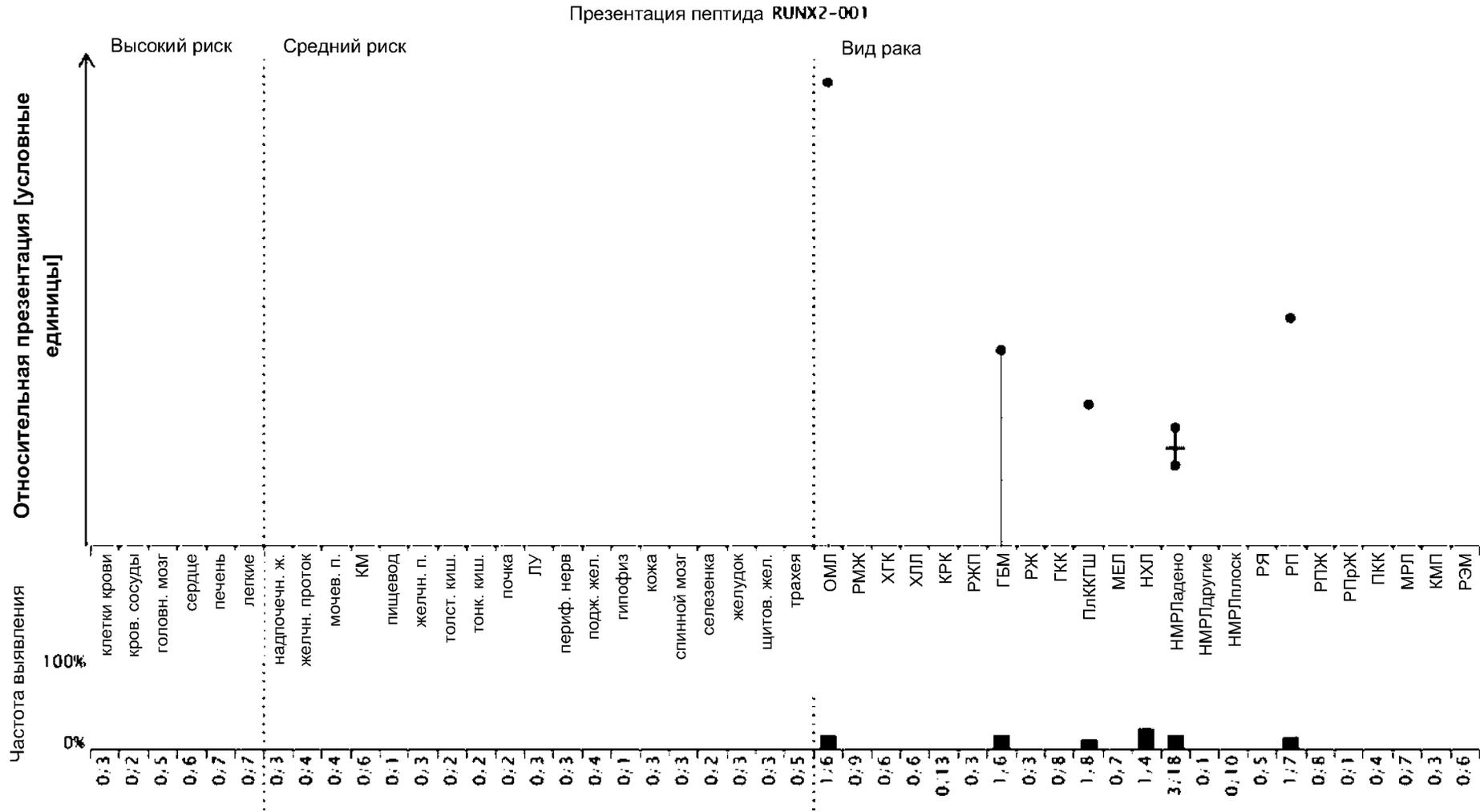
Фигура 1Е

Пептид: NPREPEKSL (B*07)
SEQ ID NO: 316



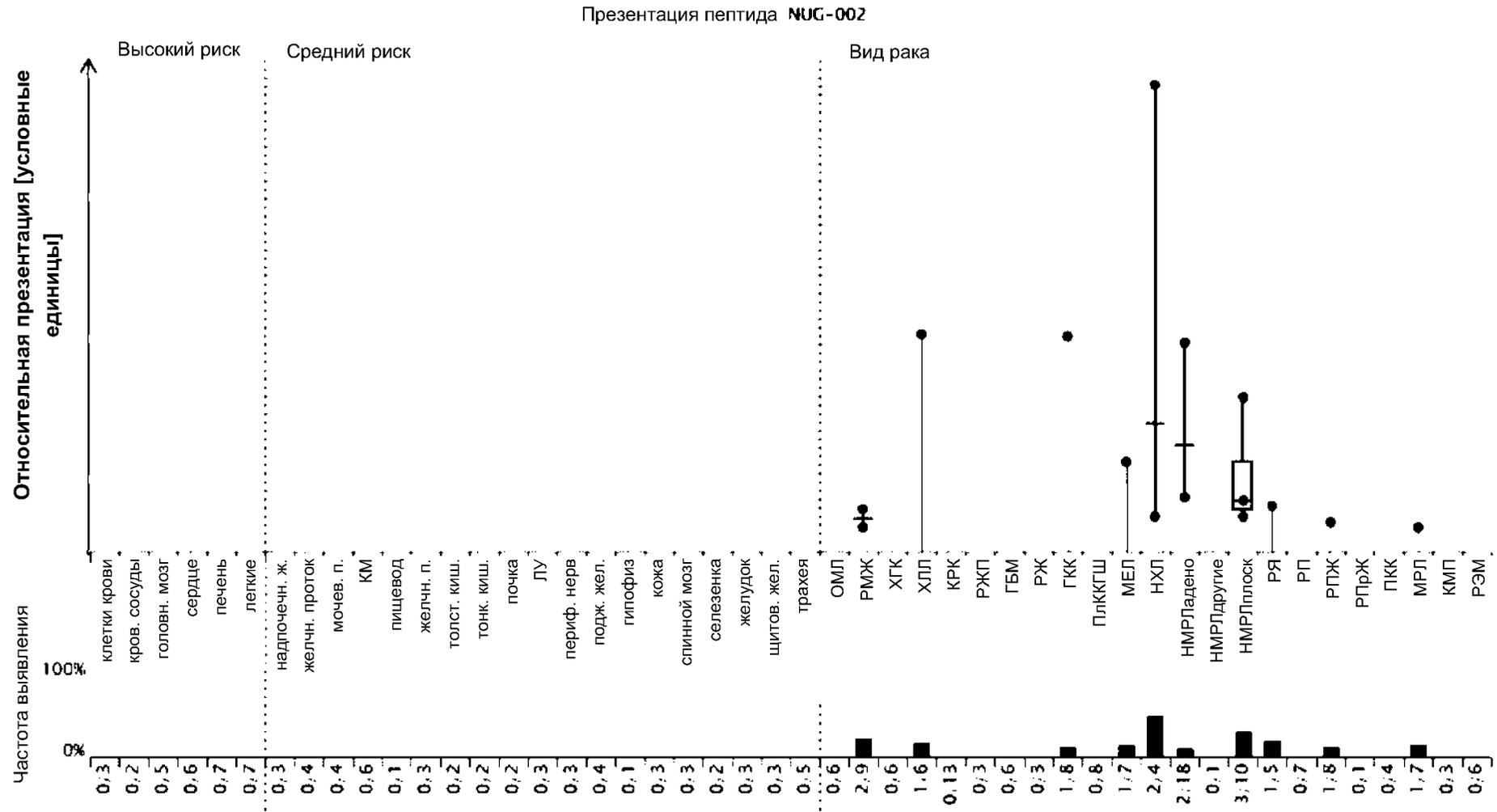
Фигура 1F

Пептид: VPPQNPRLPSL (B*07)
SEQ ID NO: 335



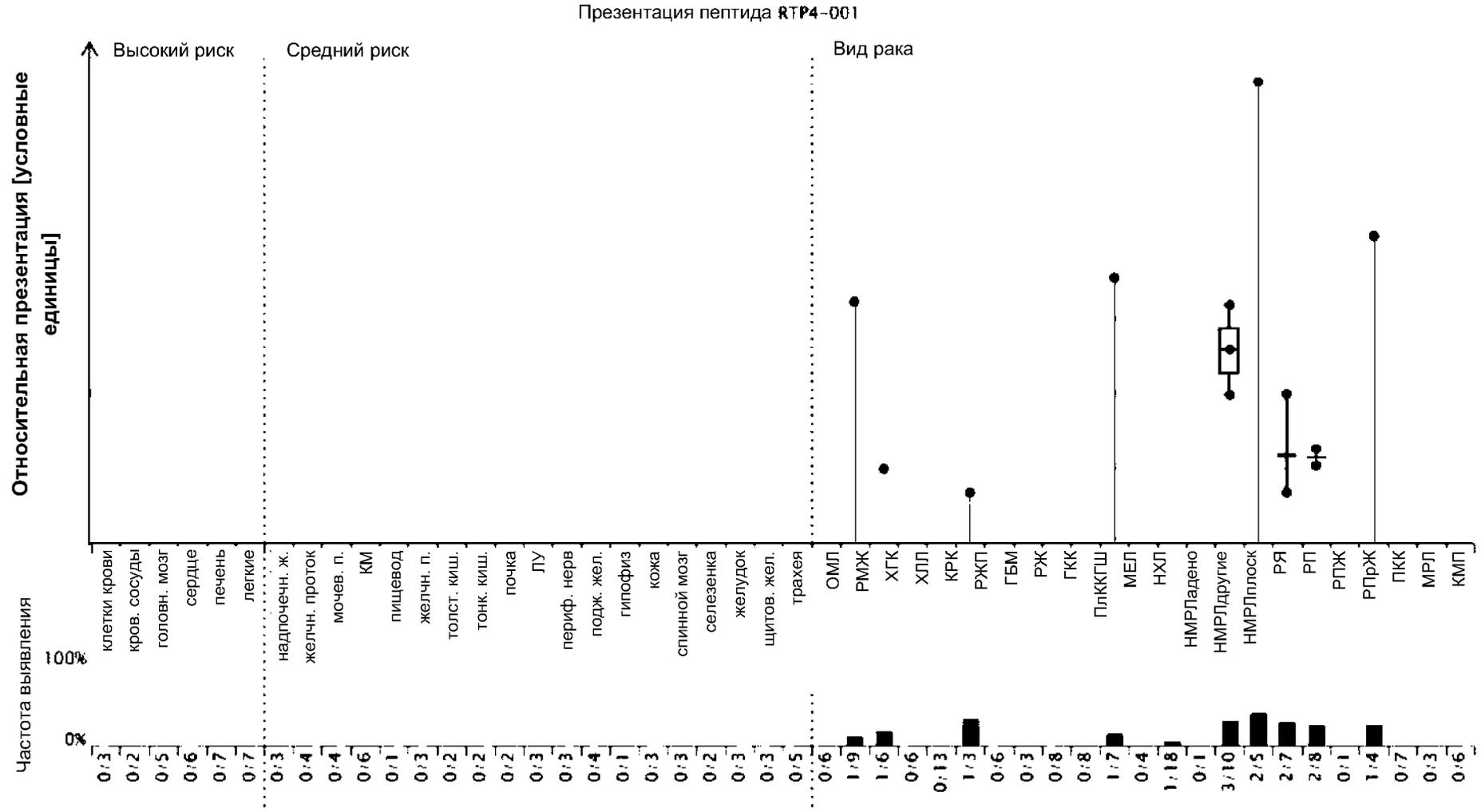
Фигура 1G

Пептид: IPTSRVITL (B*07)
SEQ ID NO: 337



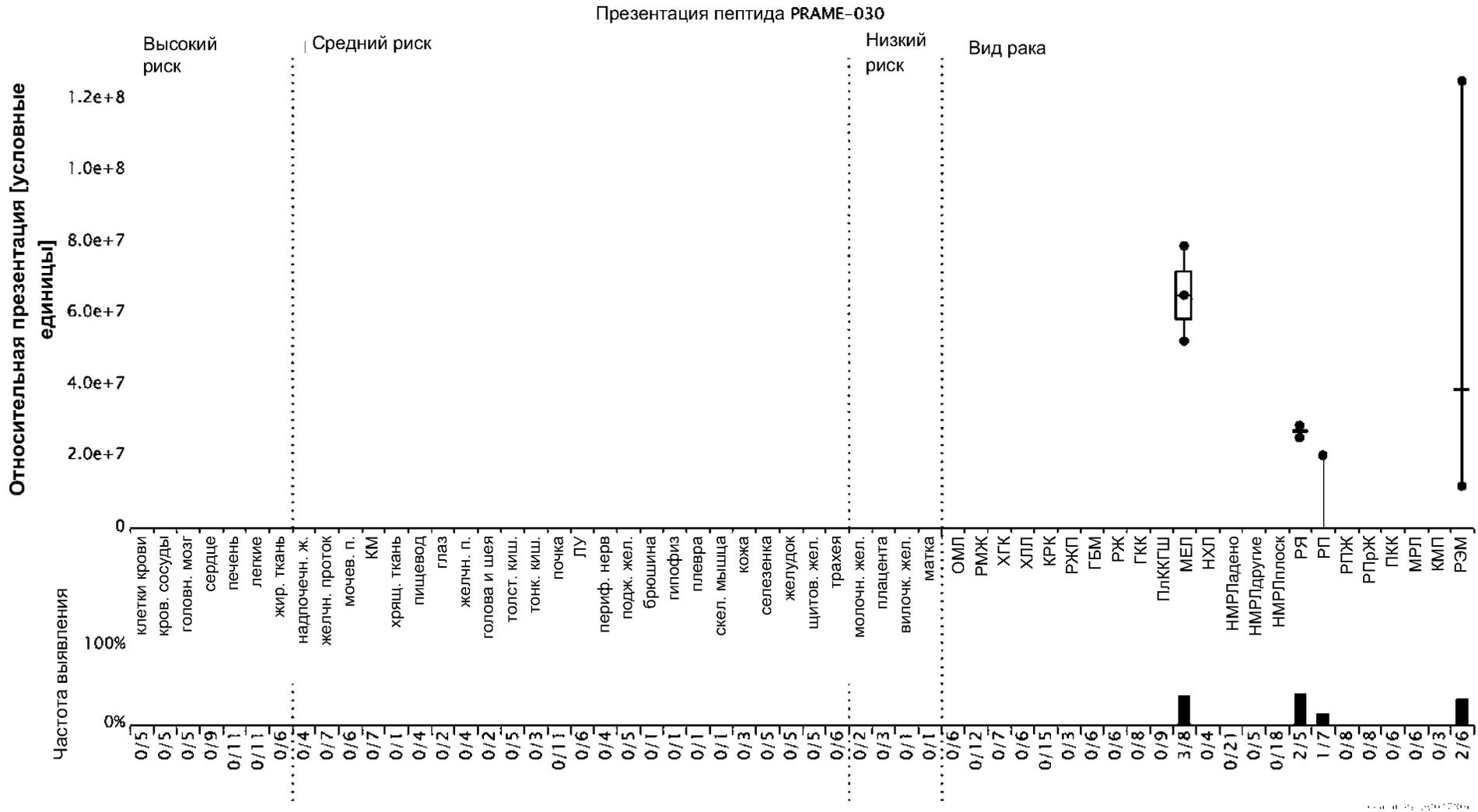
Фигура 1Н

Пептид: KPRATWTL (B*07)
SEQ ID NO: 353



Фигура 11

Пептид: SPRLRLVELAGQSL (B*07), SEQ ID NO: 359

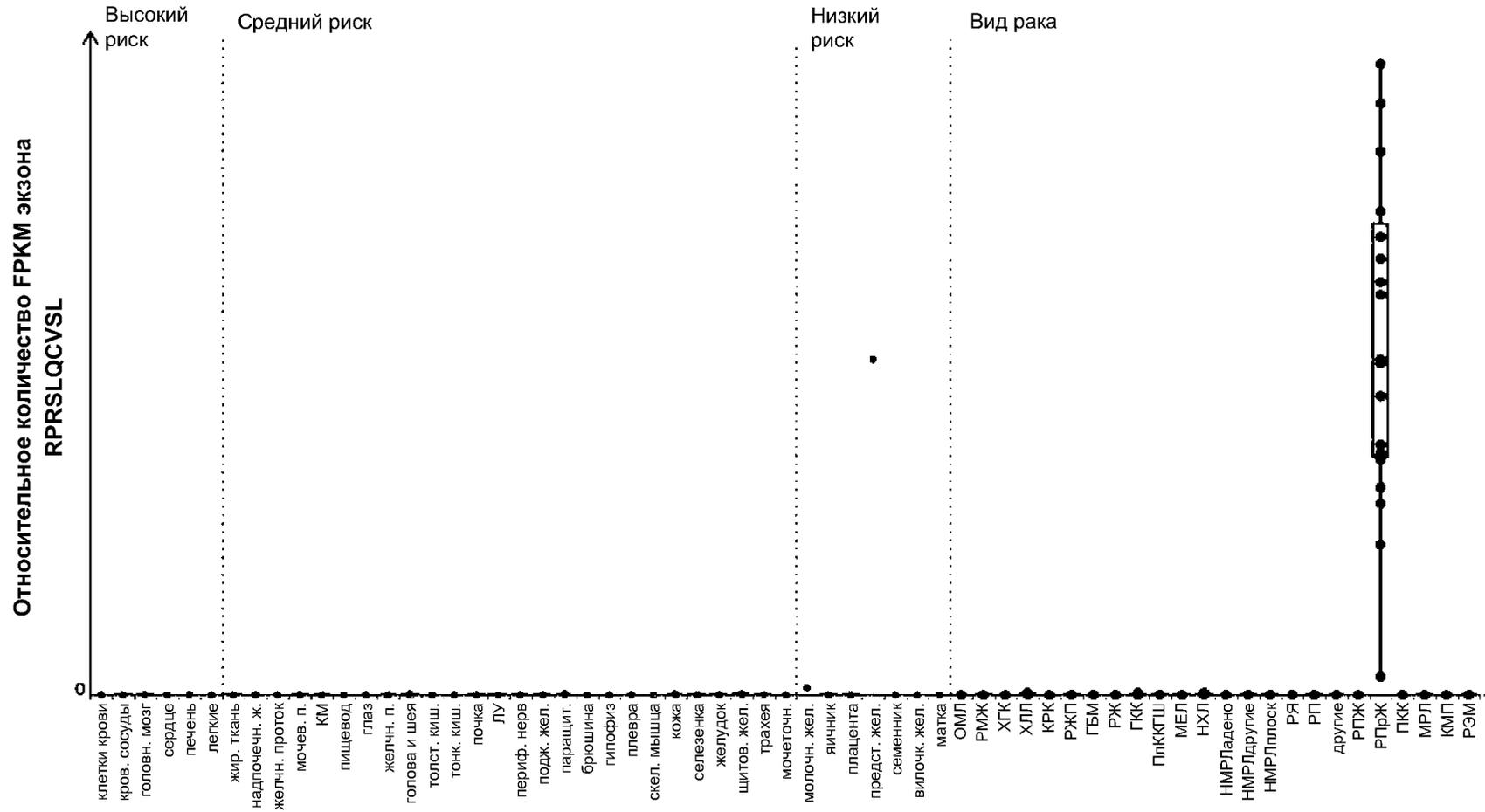


Фигура 2А

Ген: KLK2

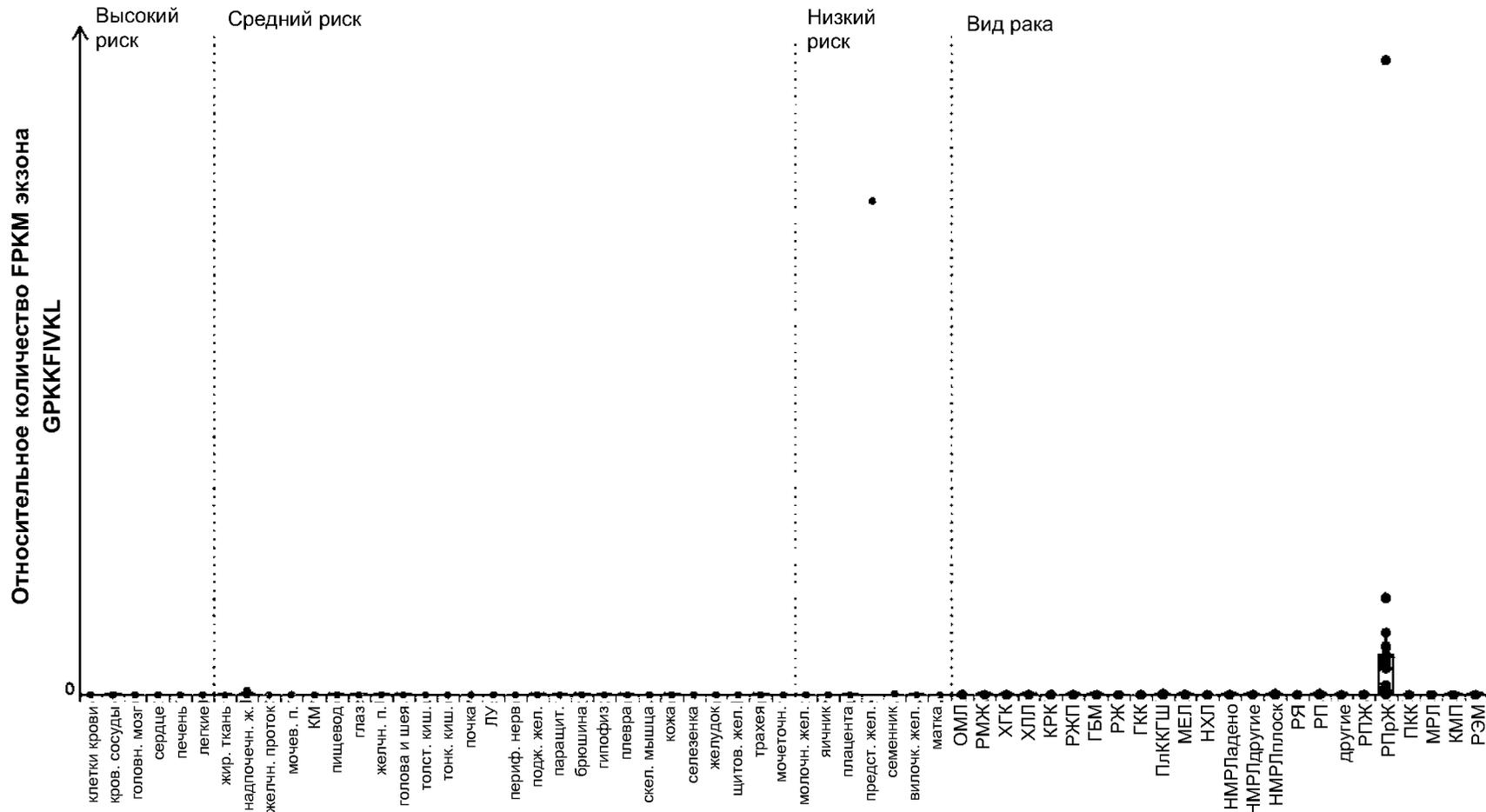
Пептид: RPRSLQCVSL

SEQ ID NO: 1



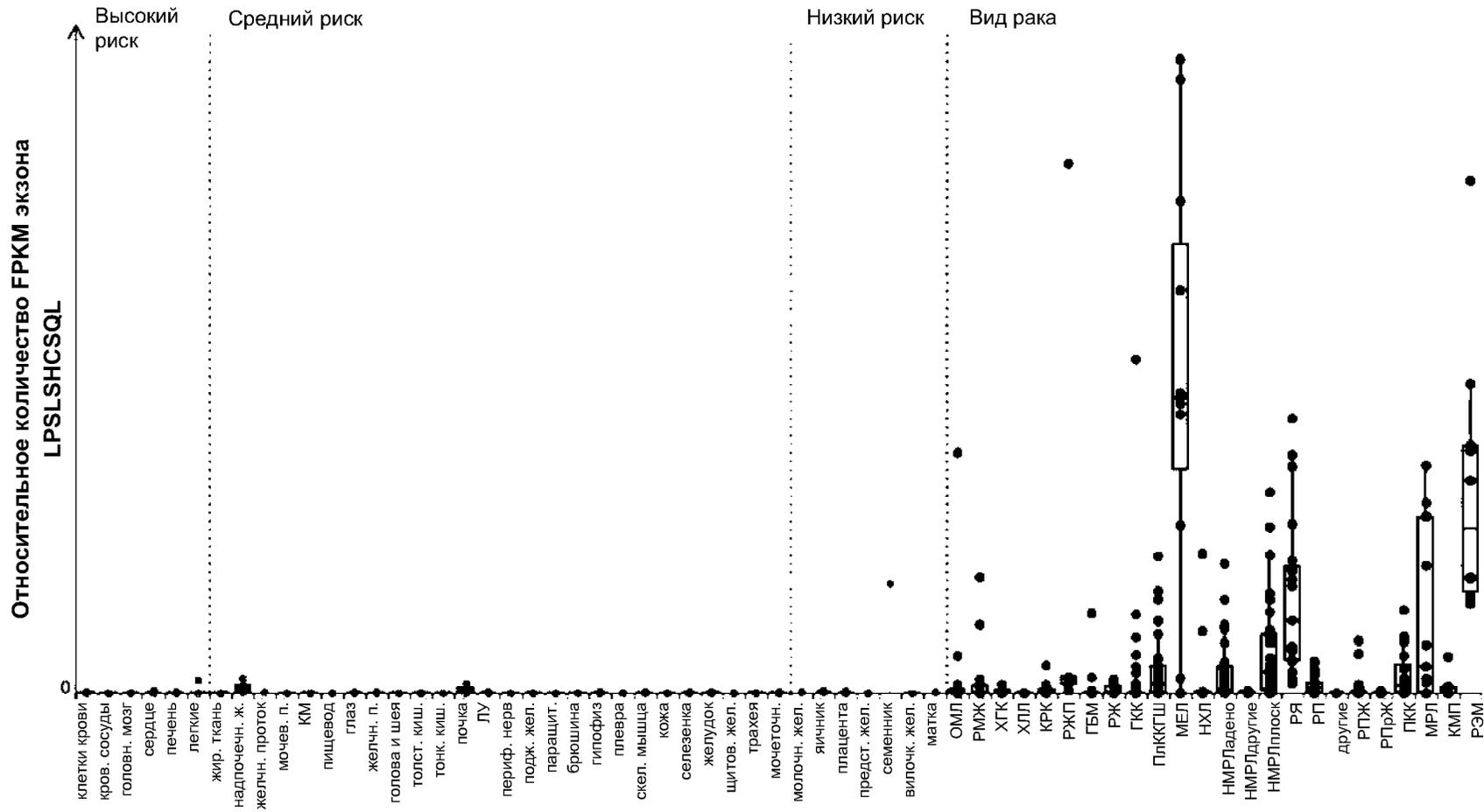
Фигура 2В

Ген: TGM4
 Пептид: GPKKFIVKL
 SEQ ID NO: 4



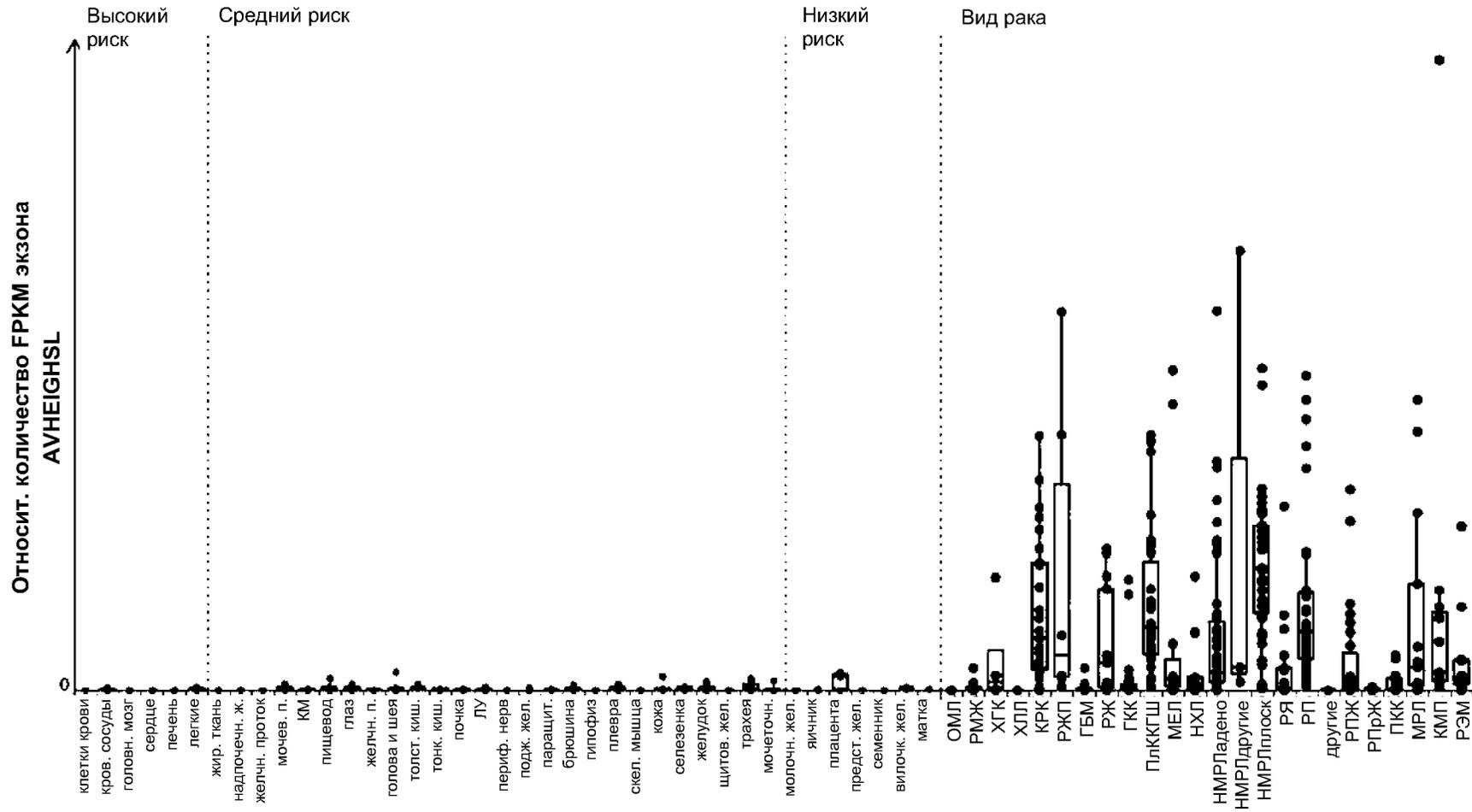
Фигура 2С

Ген: PRAME
 Пептид: LPSLSHCSQL
 SEQ ID NO: 5



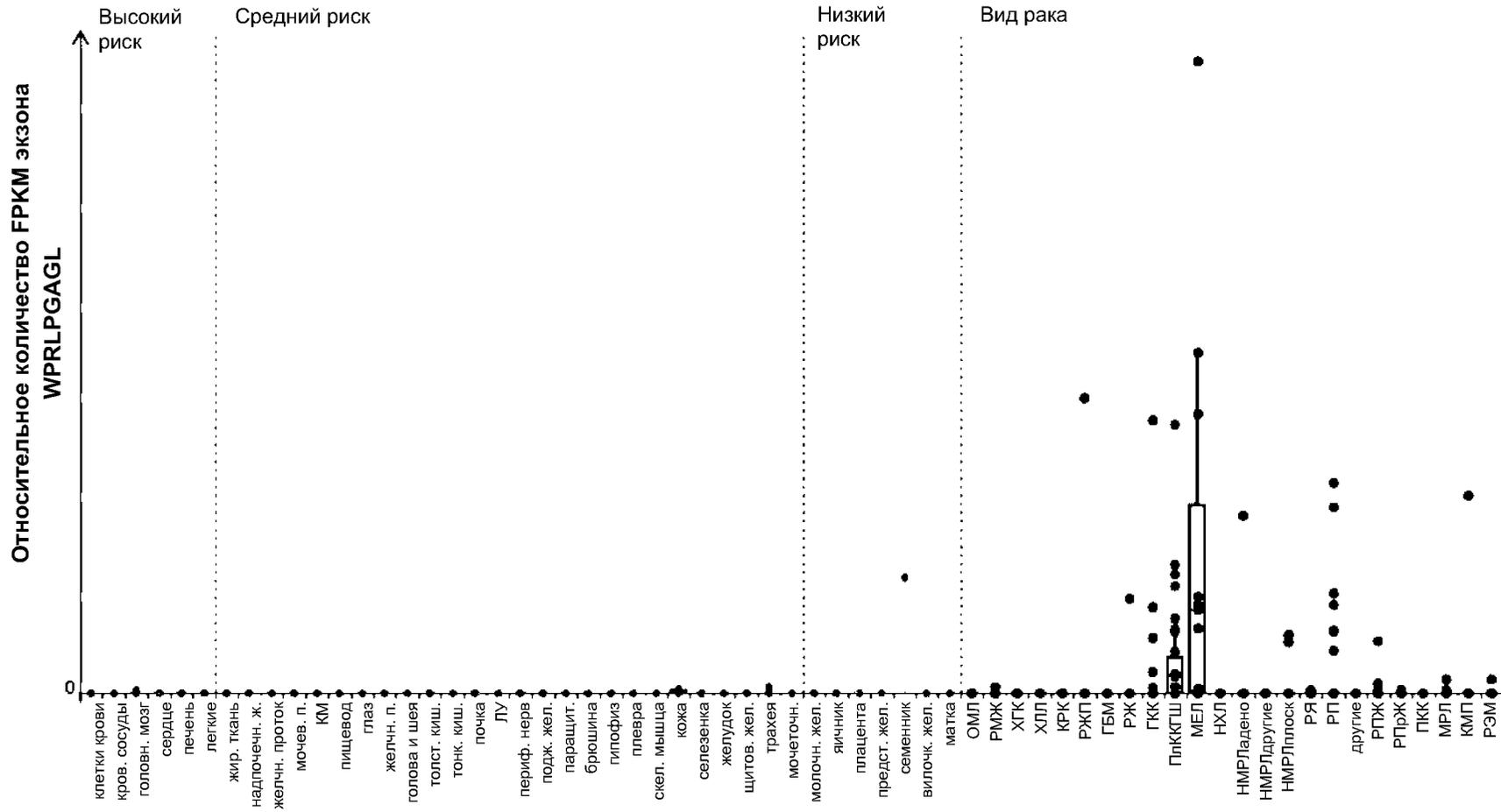
Фигура 2D

Ген: MMP12
 Пептид: AVHEIGHSL
 SEQ ID NO: 14



Фигура 2Е

Ген: FAM178B
 Пептид: WPRLPGAGL
 SEQ ID NO: 19

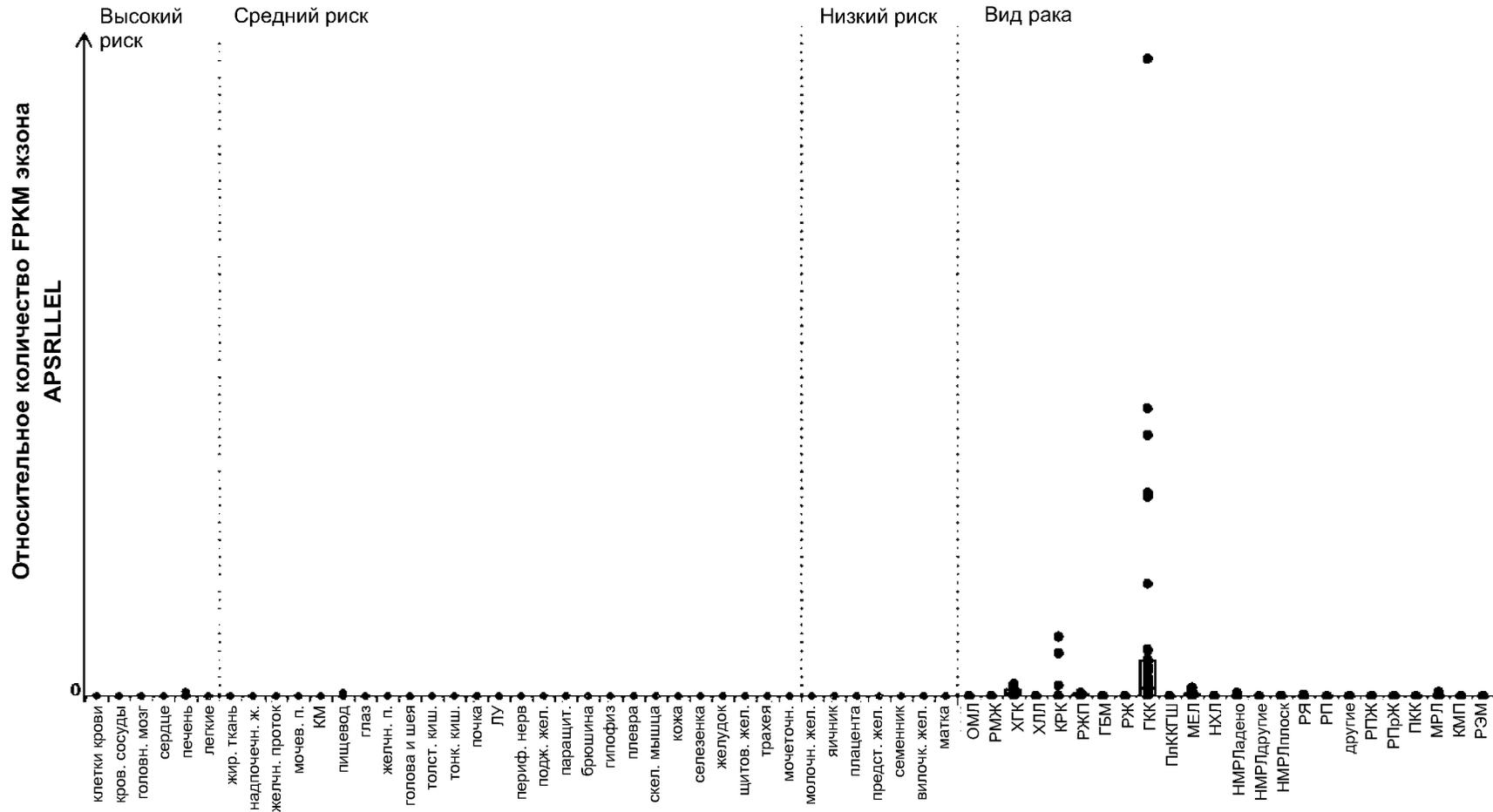


Фигура 2F

Ген: LOC645382/LOC645399/PRAMEF10

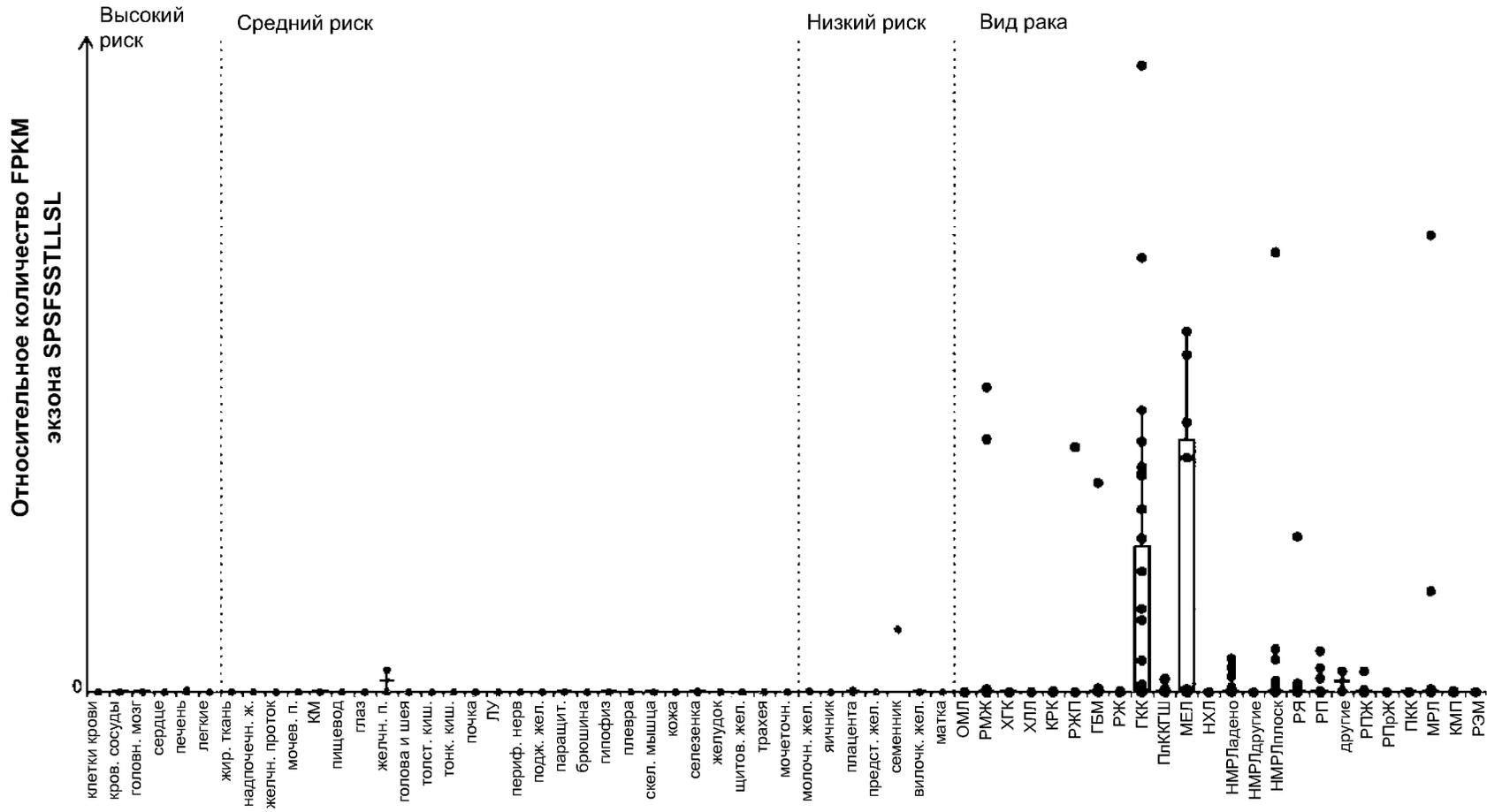
Пептид: APSRLLEL

SEQ ID NO: 21



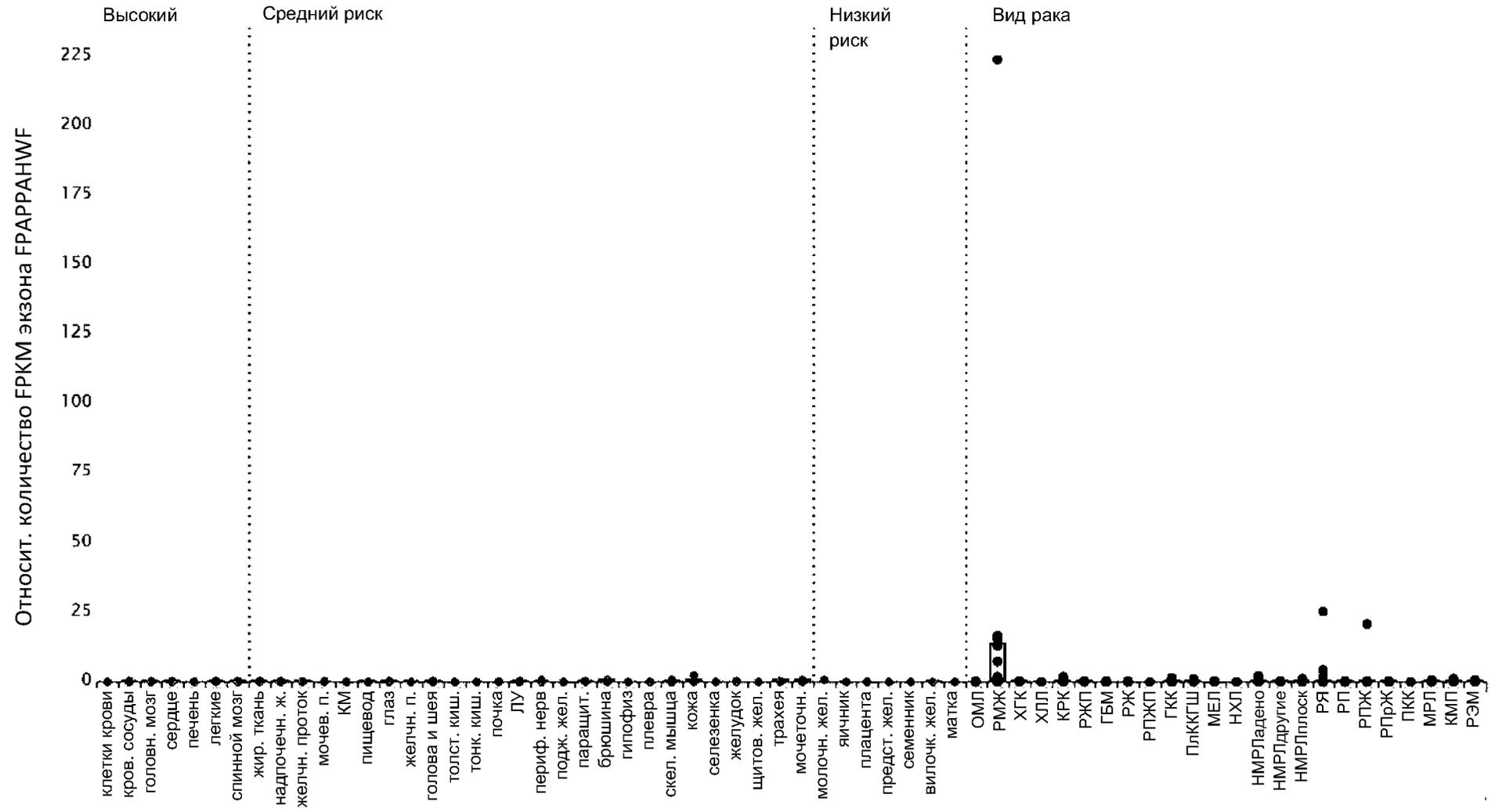
Фигура 2G

Ген: **MAGEC1**
 Пептид: **SPSFSSTLLSL**
 SEQ ID NO: 26



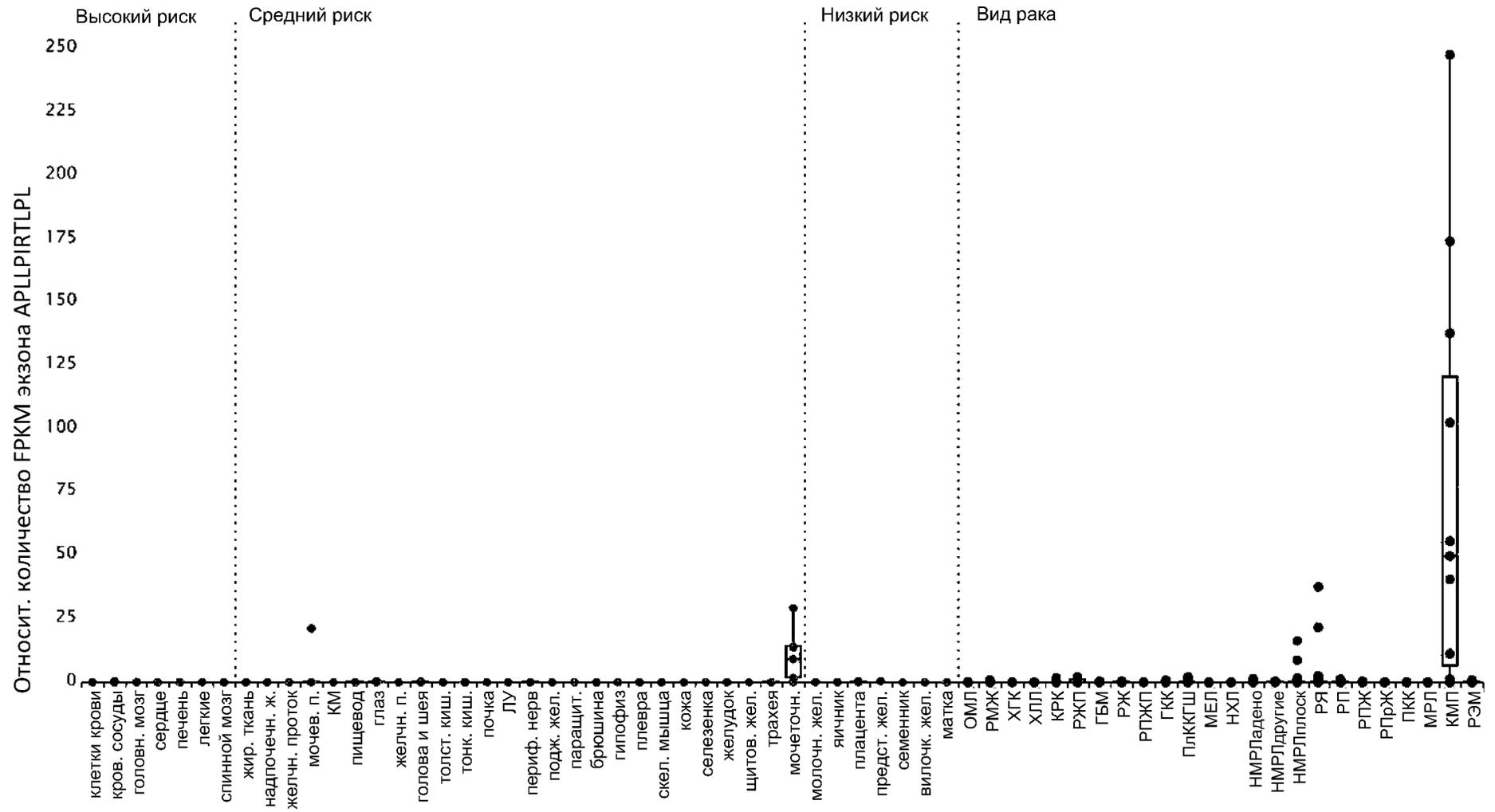
Фигура 2Н

Ген: CYP4Z1/CYP4Z2P, пептид: FRAPPANWF, SEQ ID NO: 16



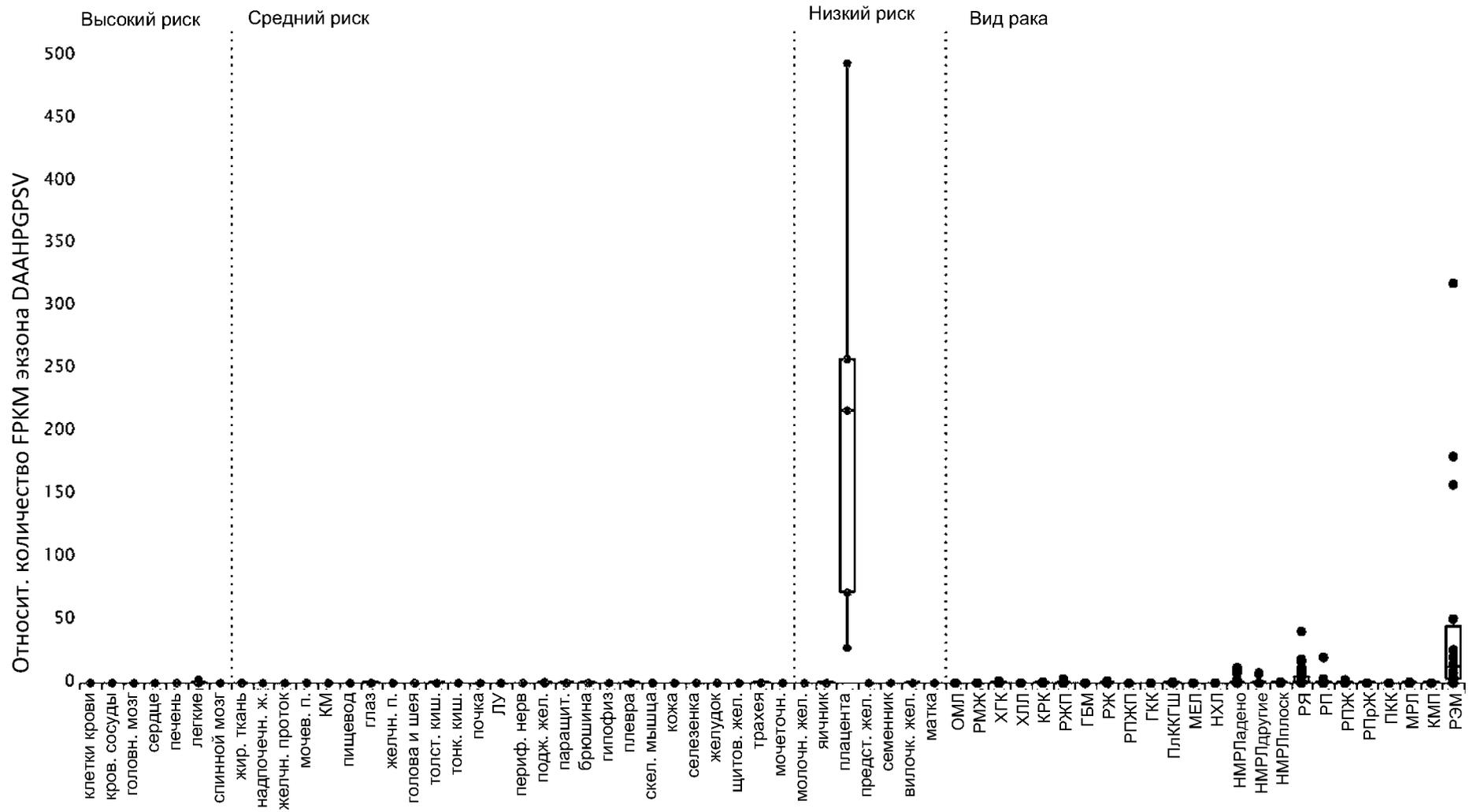
Фигура 21

Ген: UPK2, пептид: APLLPIRTLPL, SEQ ID NO: 58



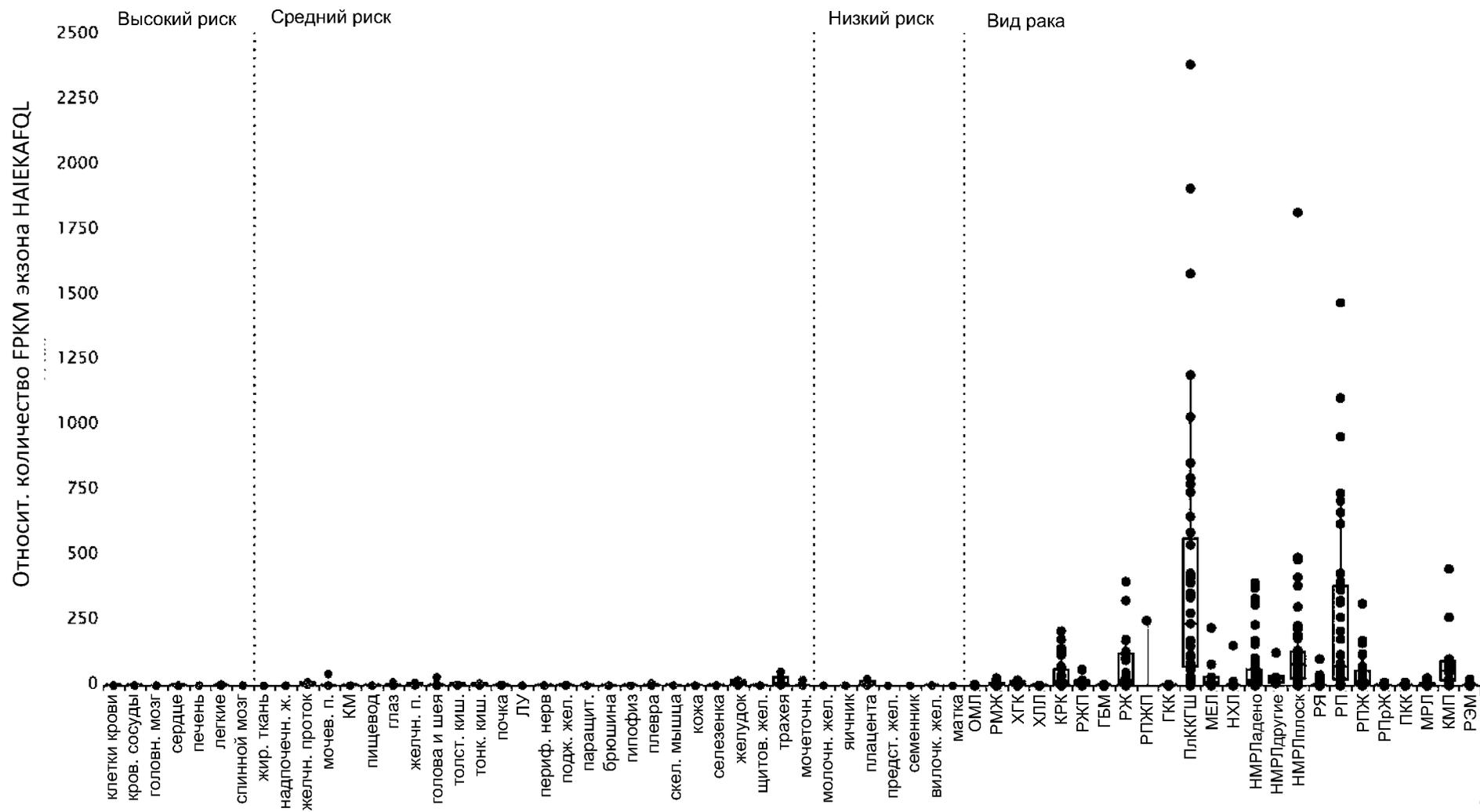
Фигура 2J

Ген: ALPPL2, пептид: DAAHPGPSV, SEQ ID NO: 82



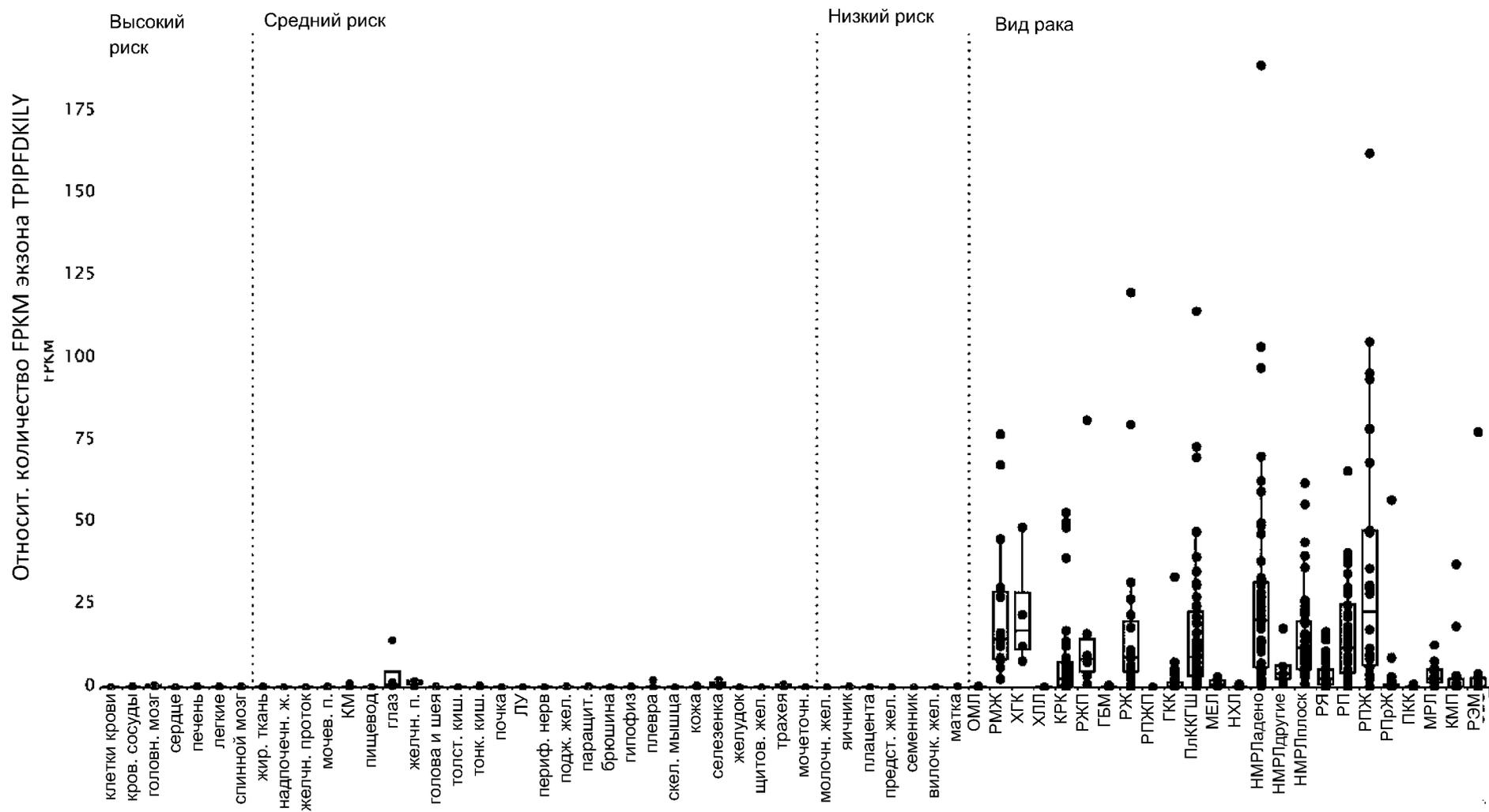
Фигура 2К

Ген: MMP1, пептид: HAIEKAFQL, SEQ ID NO: 90



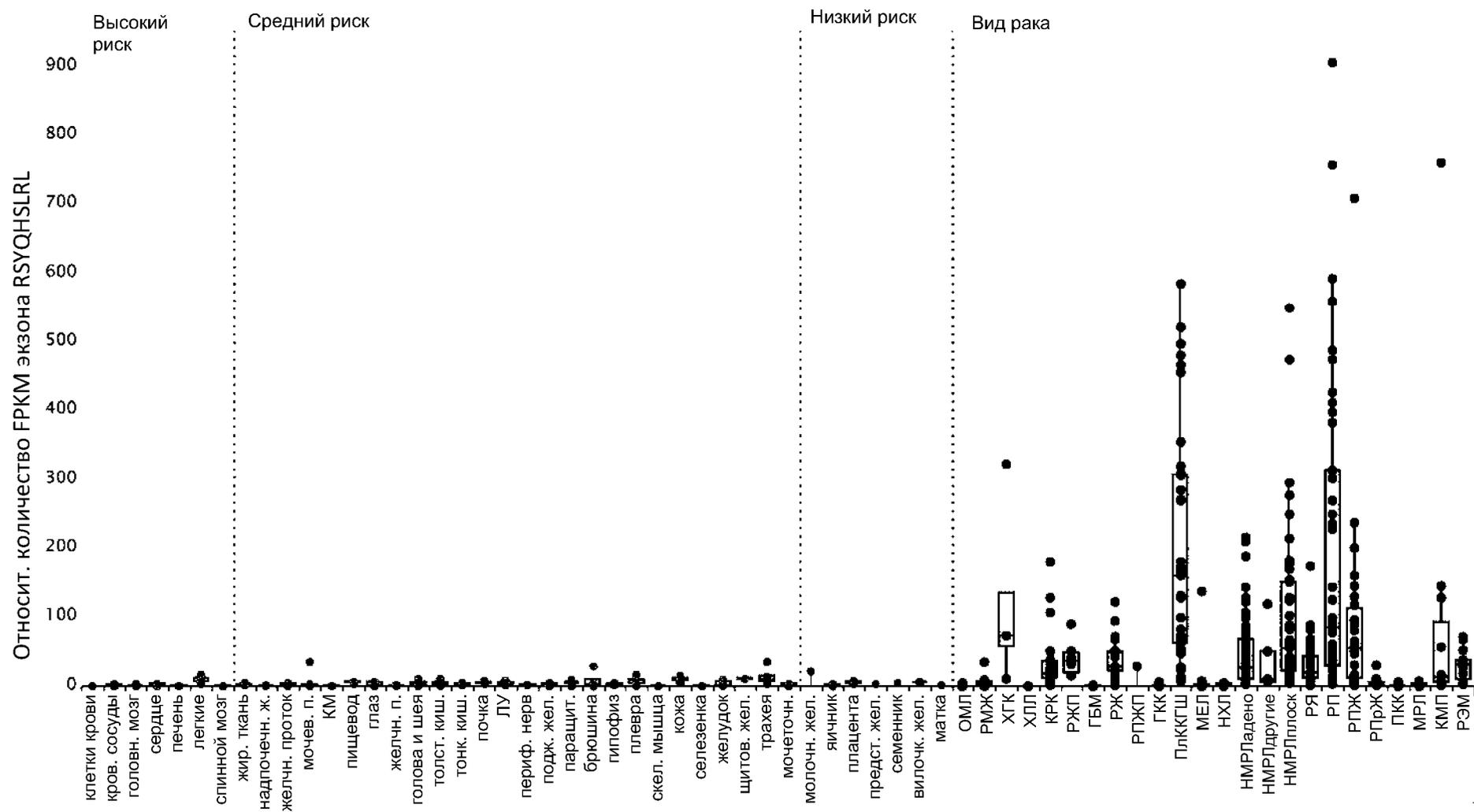
Фигура 2L

Ген: COL10A1, пептид: TRIPFDKILY, SEQ ID NO: 100



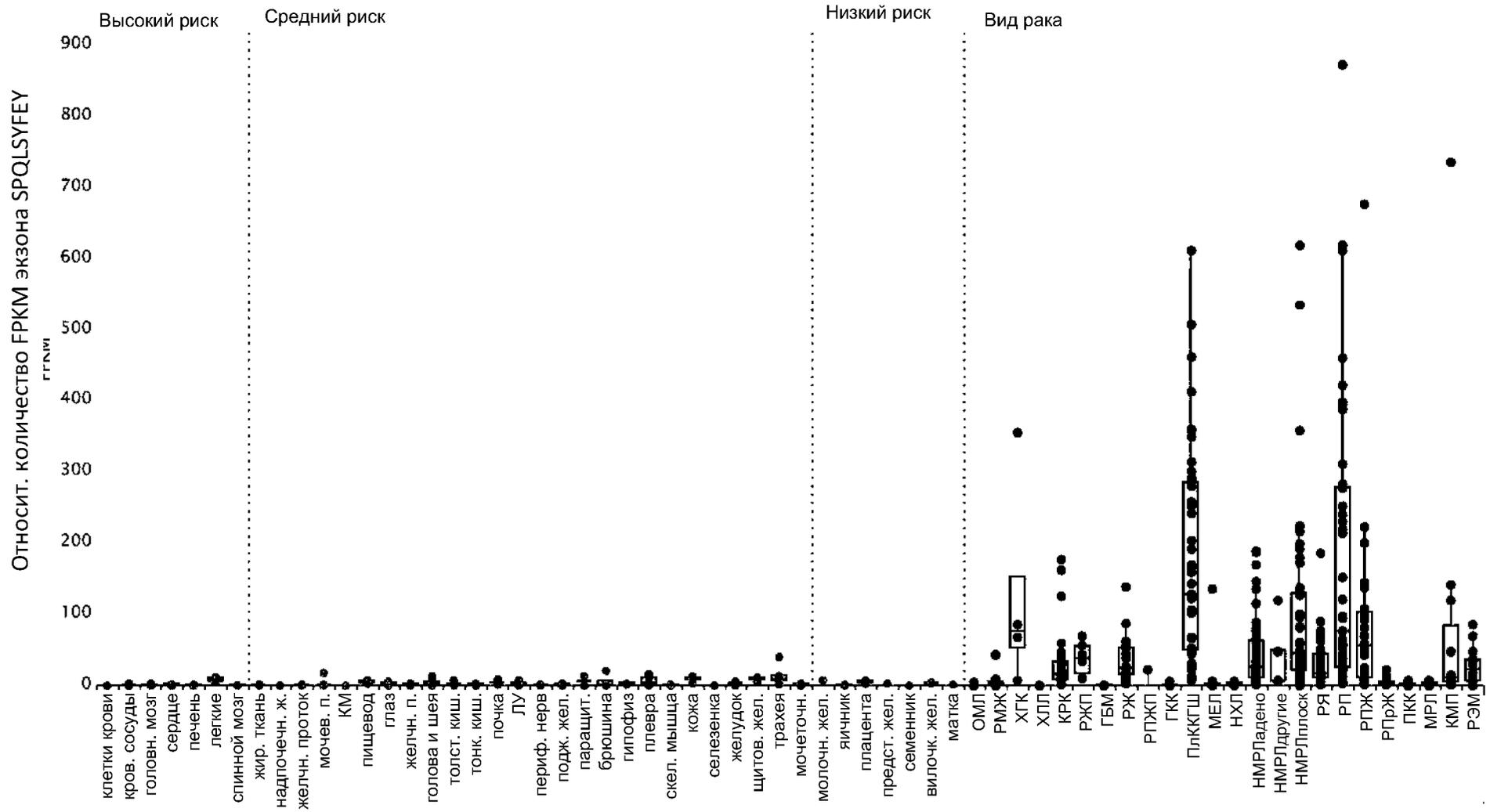
Фигура 2М

Ген: LAMC2, пептид: RSYQHSLRL, SEQ ID NO: 116



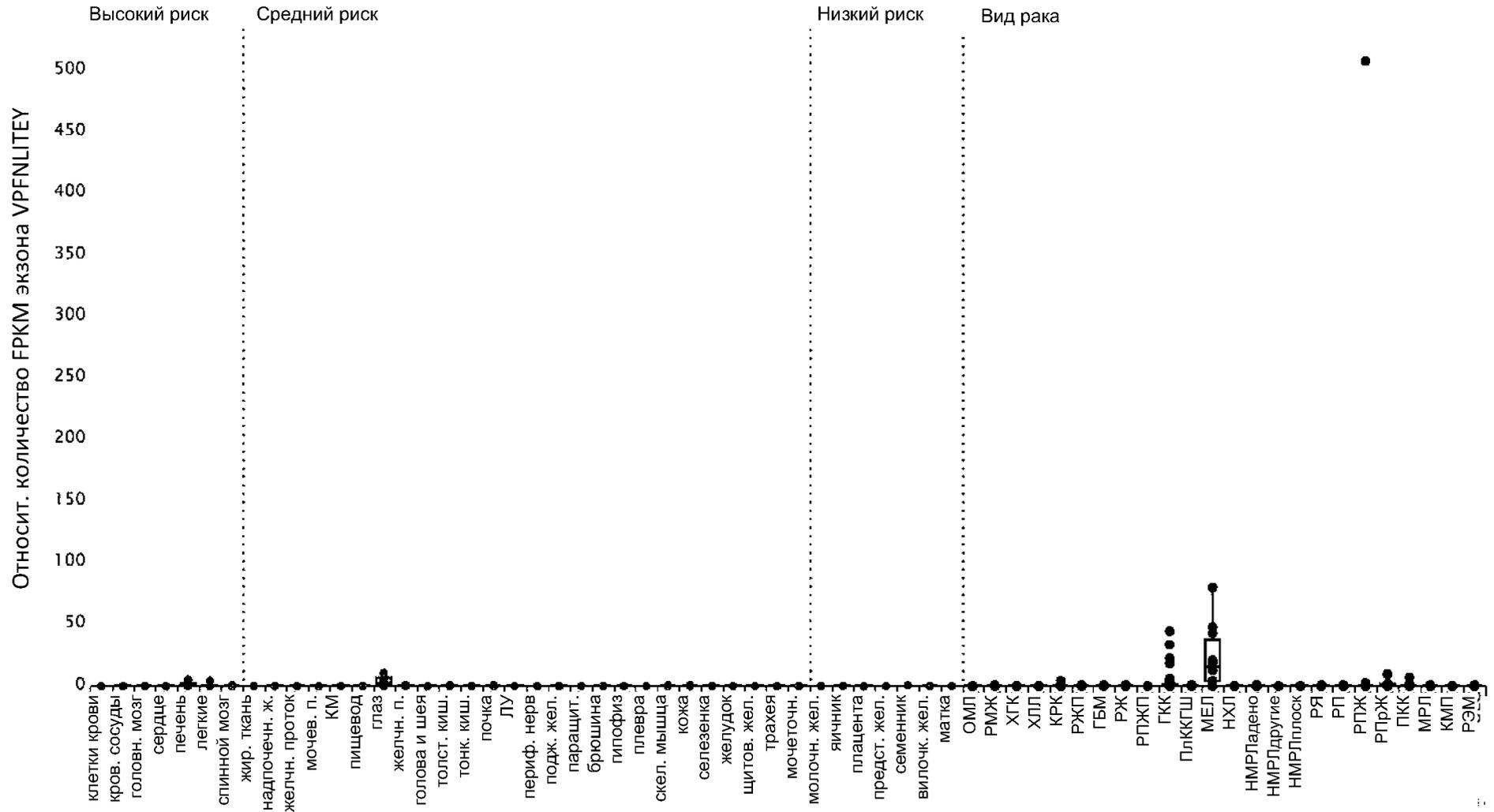
Фигура 2N

Ген: LAMC2, пептид: SPQLSYFEY, SEQ ID NO: 137



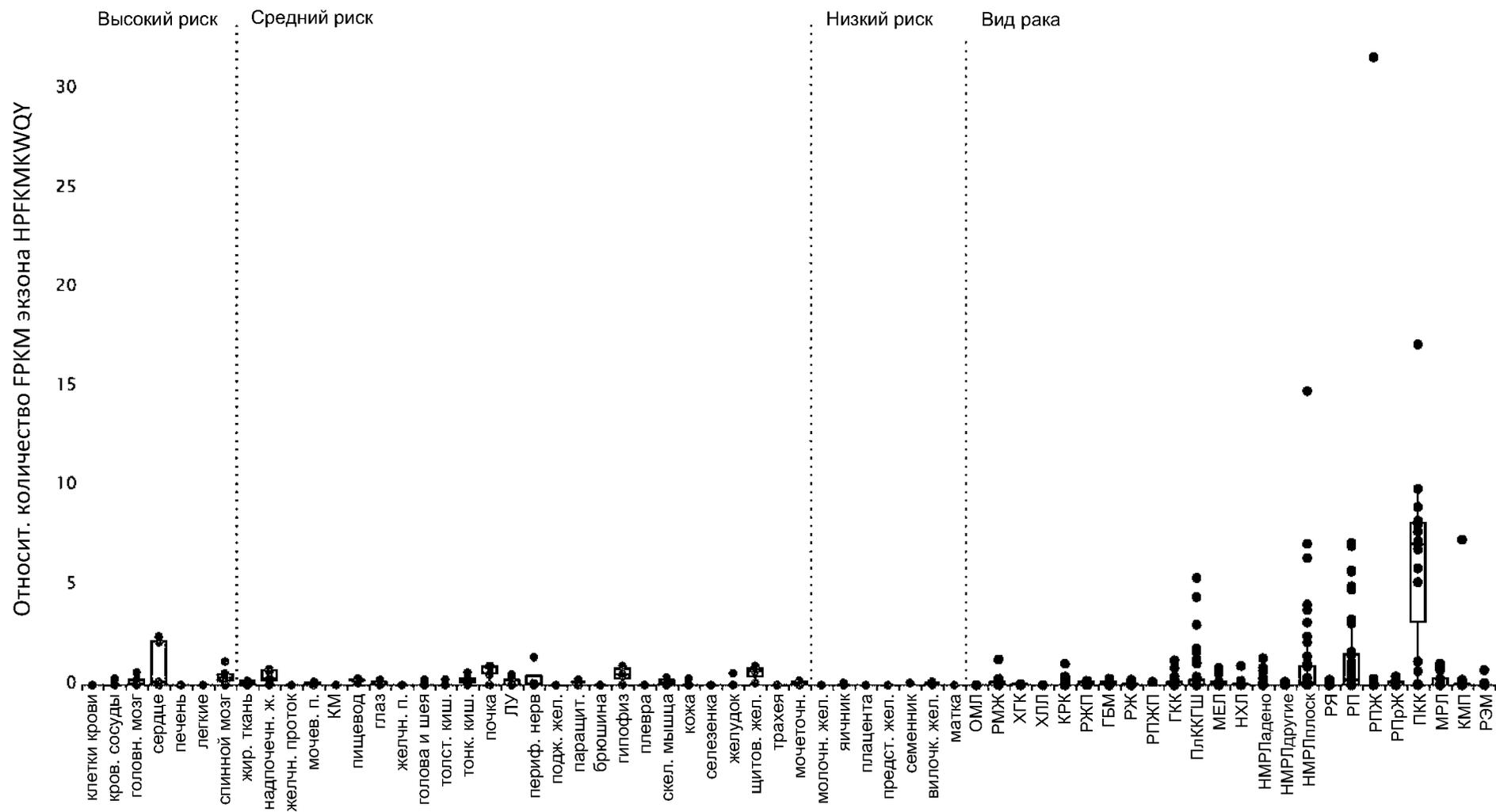
Фигура 20

Ген: SLC45A2, пептид: VPFNLITEY, SEQ ID NO: 138



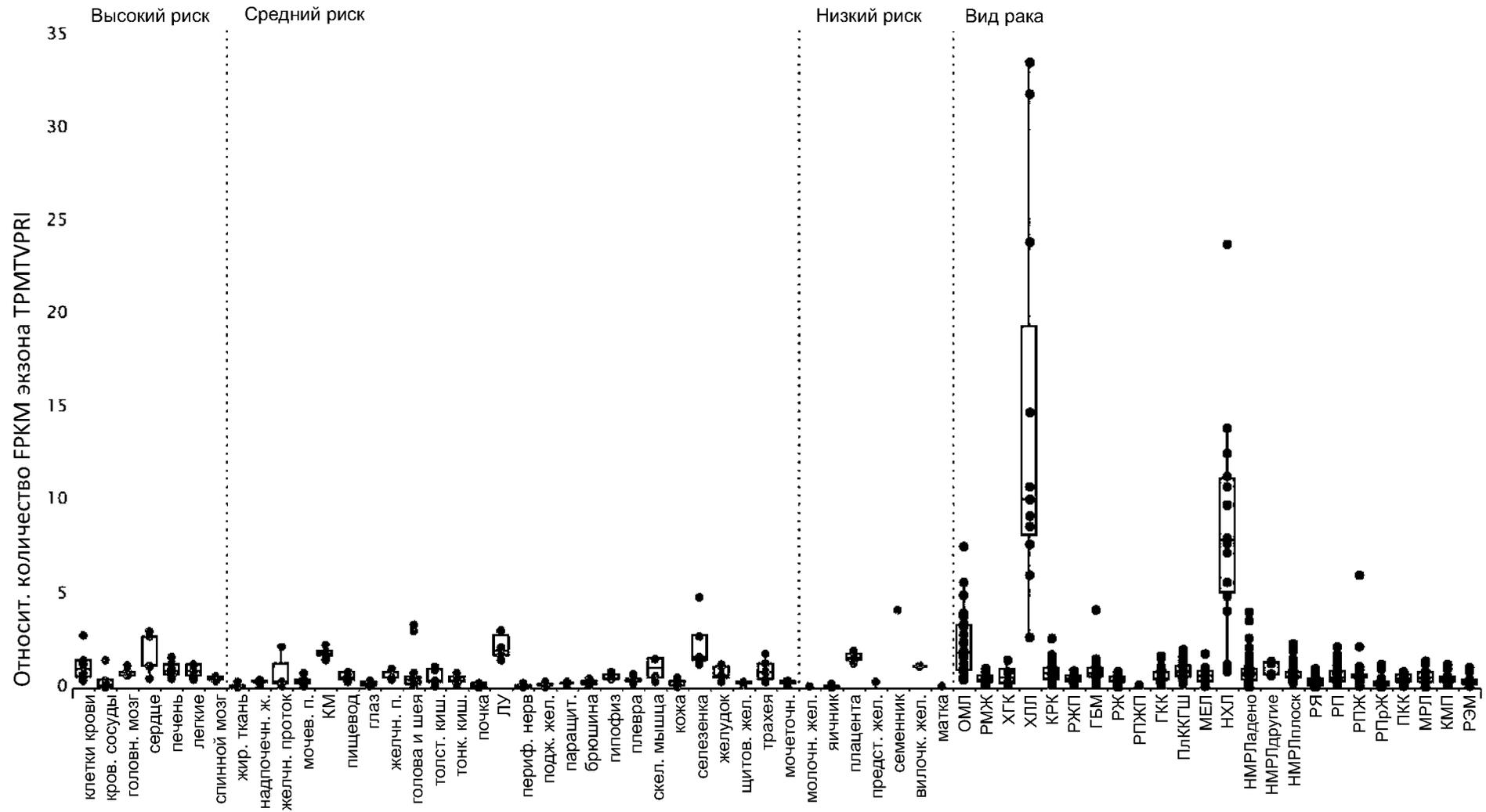
Фигура 2Р

Ген: QRFPR, пептид: HPFKMKWQY, SEQ ID NO: 142



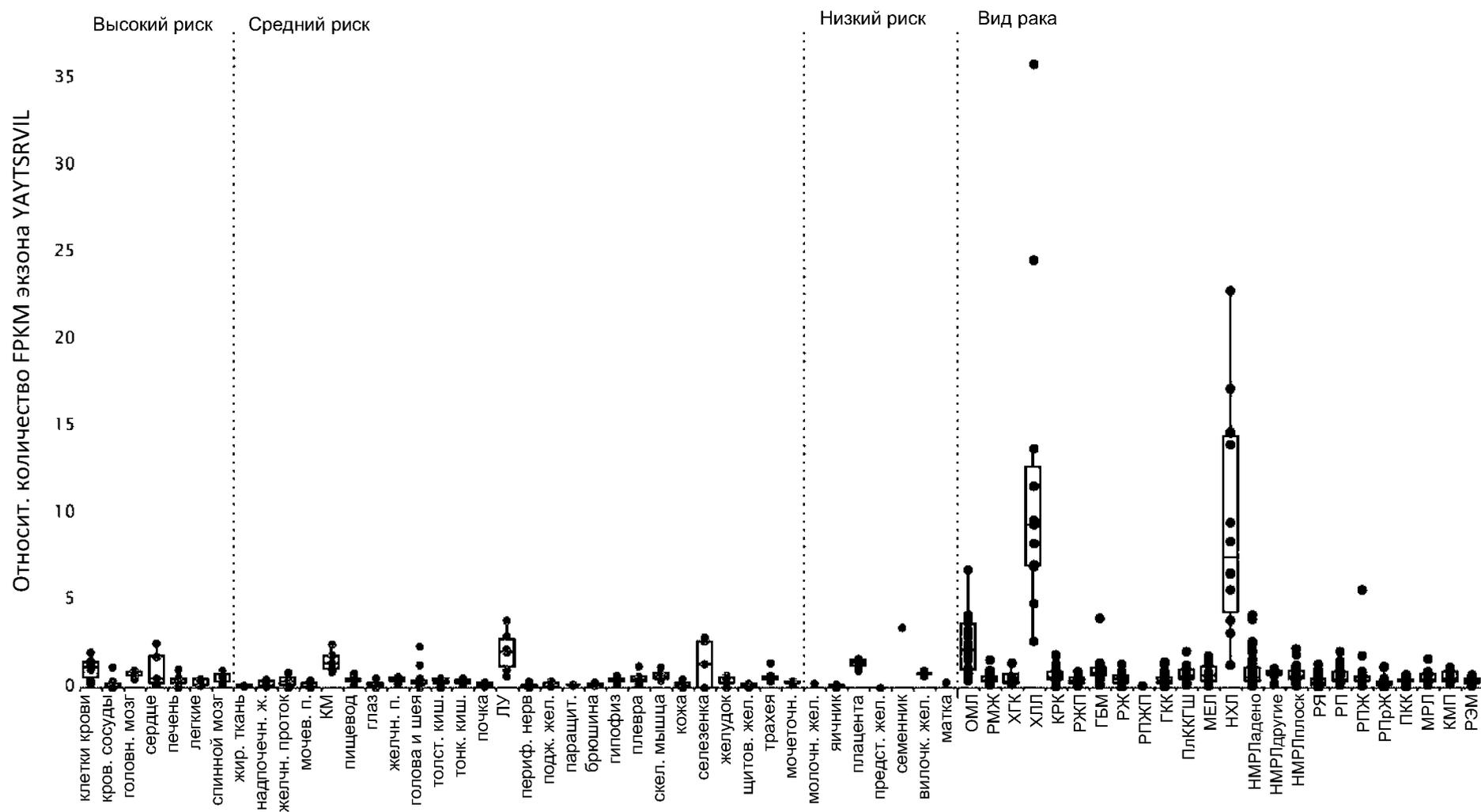
Фигура 2Q

Ген: KBTBD8, пептид: TPMTVPRI, SEQ ID NO: 159



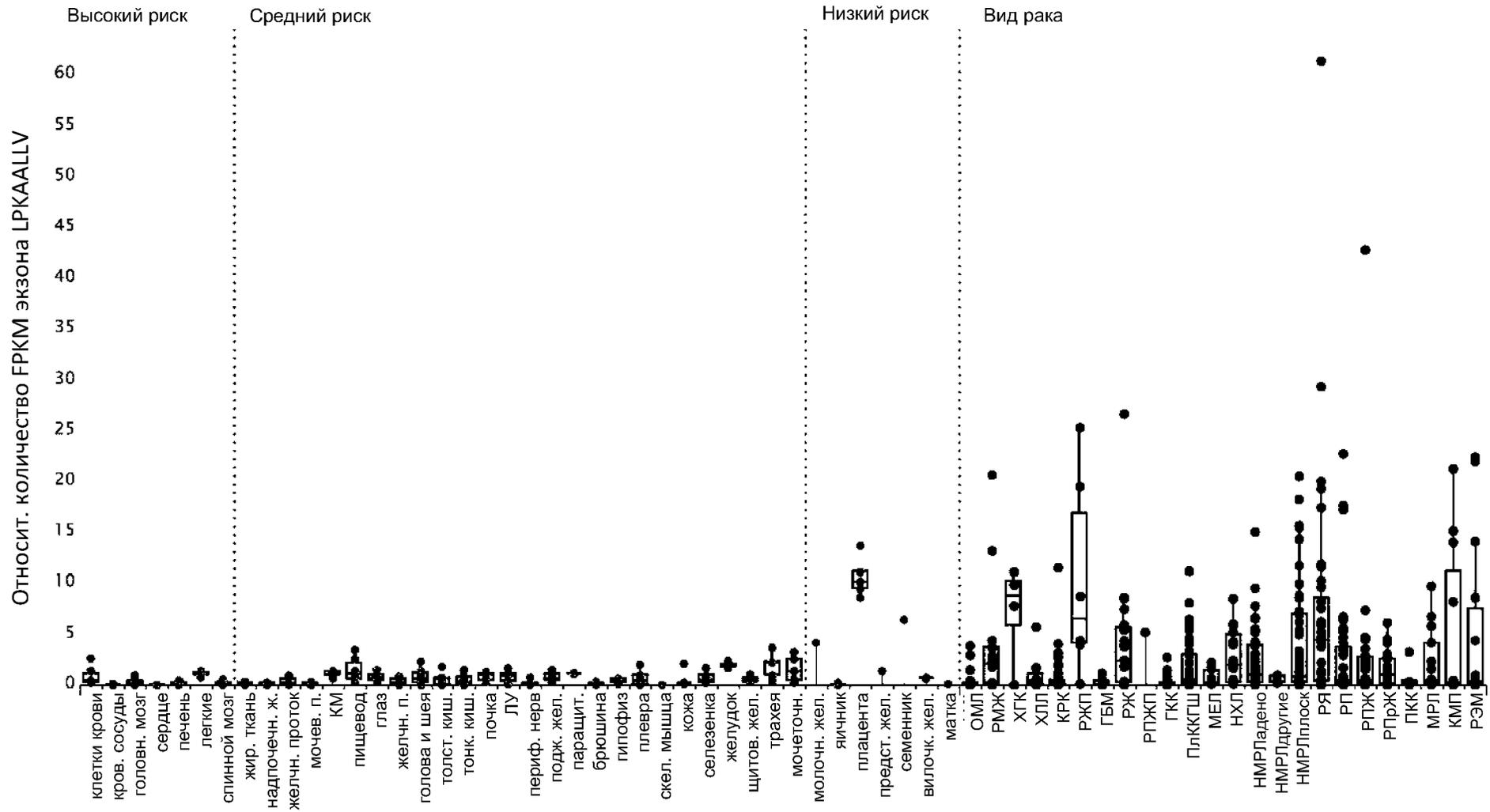
Фигура 2R

Ген: KBTBD8, пептид: YAYTSRVIL, SEQ ID NO: 166



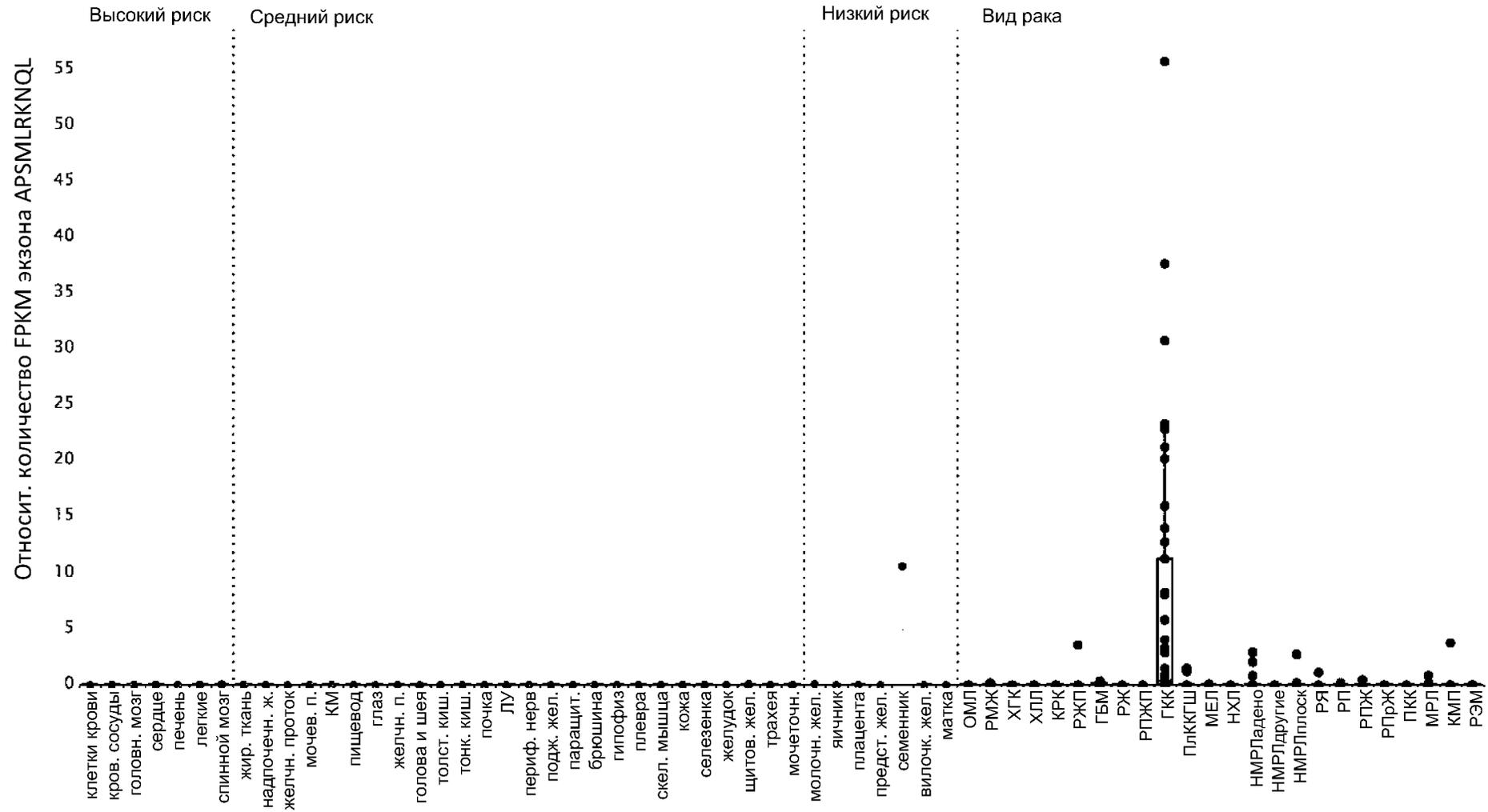
Фигура 2S

Ген: NLRP2, пептид: LPKAALLV, SEQ ID NO: 241

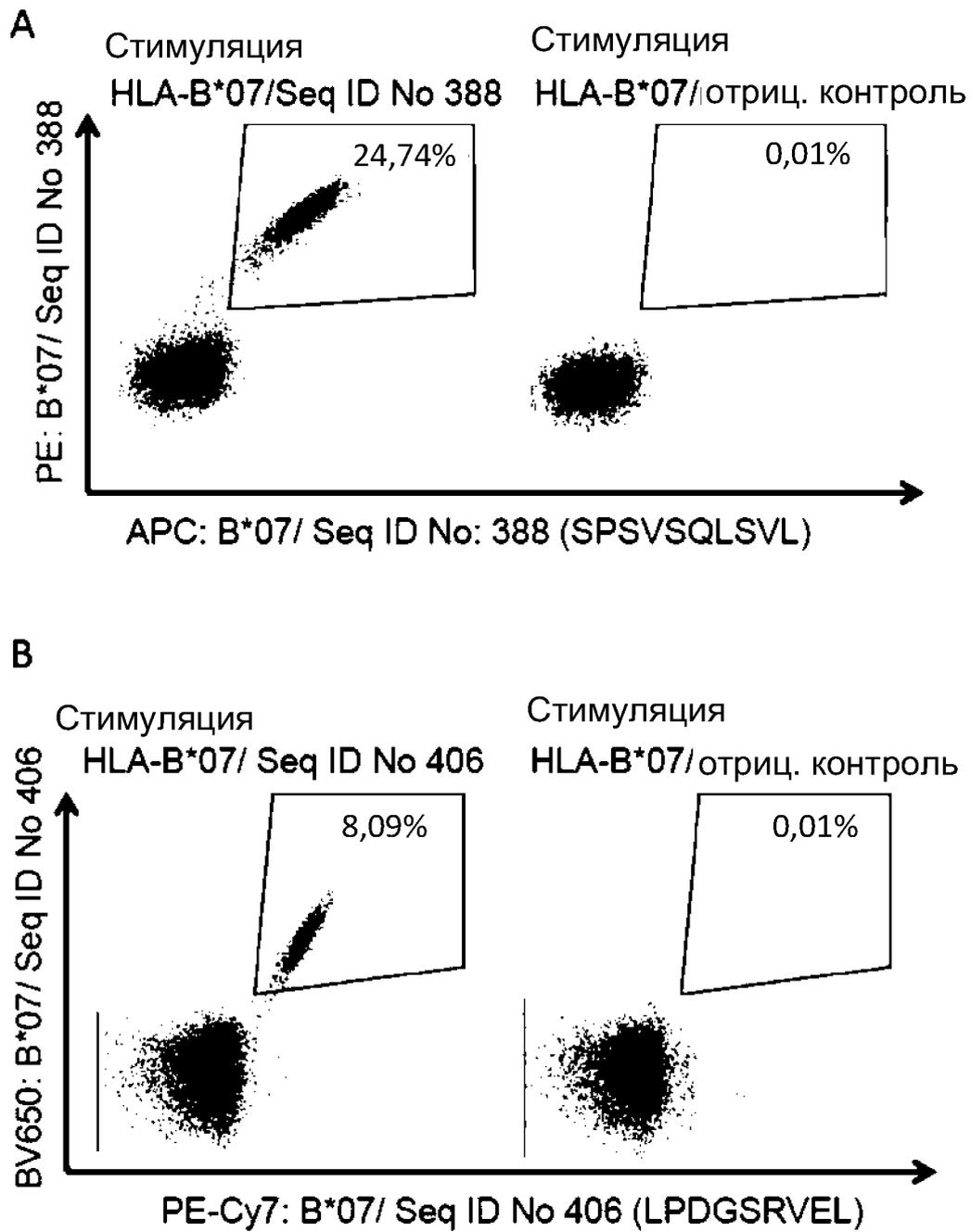


Фигура 2Т

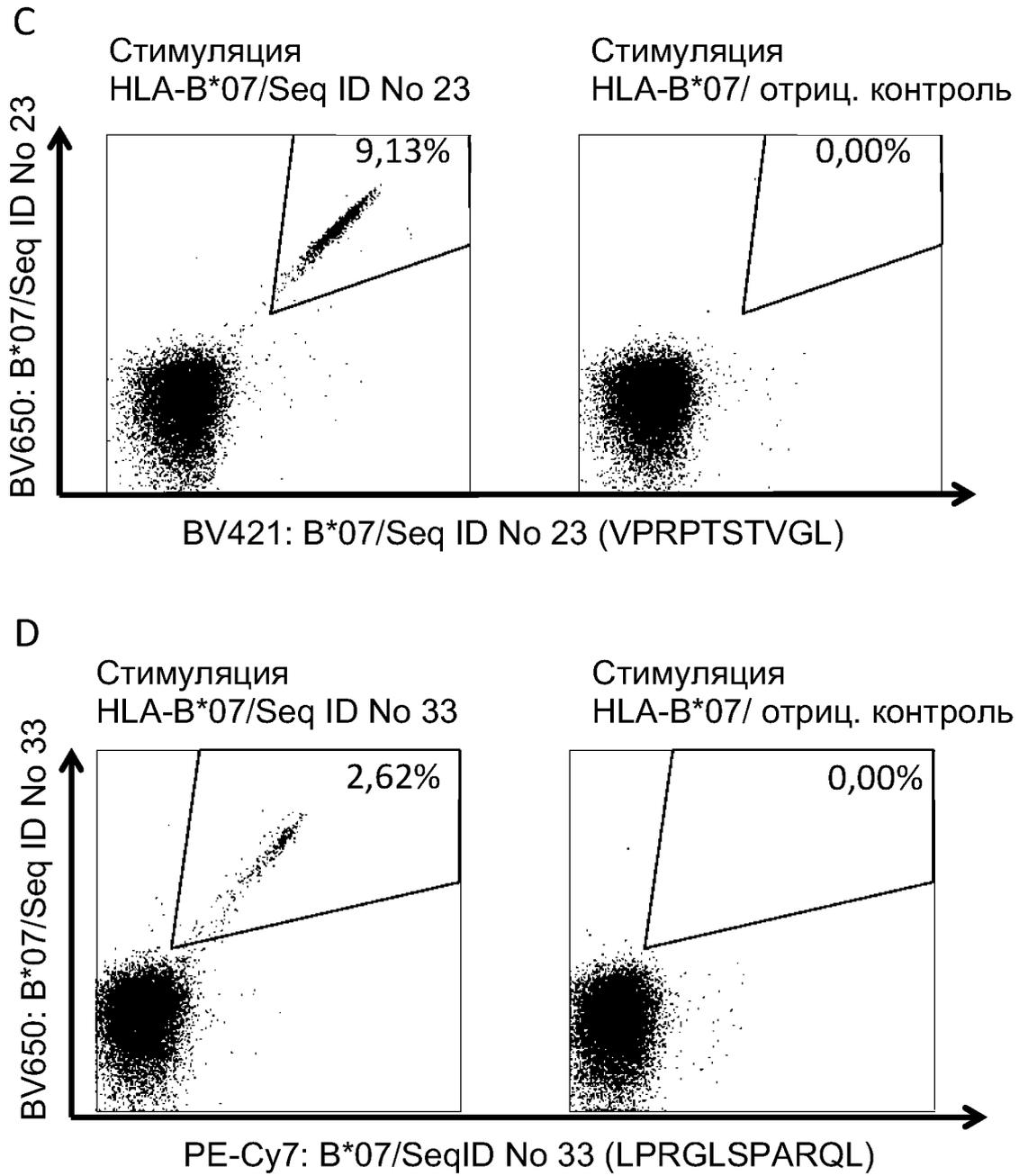
Ген: DCAF4L2, пептид: APSMLRKNQL, SEQ ID NO: 358



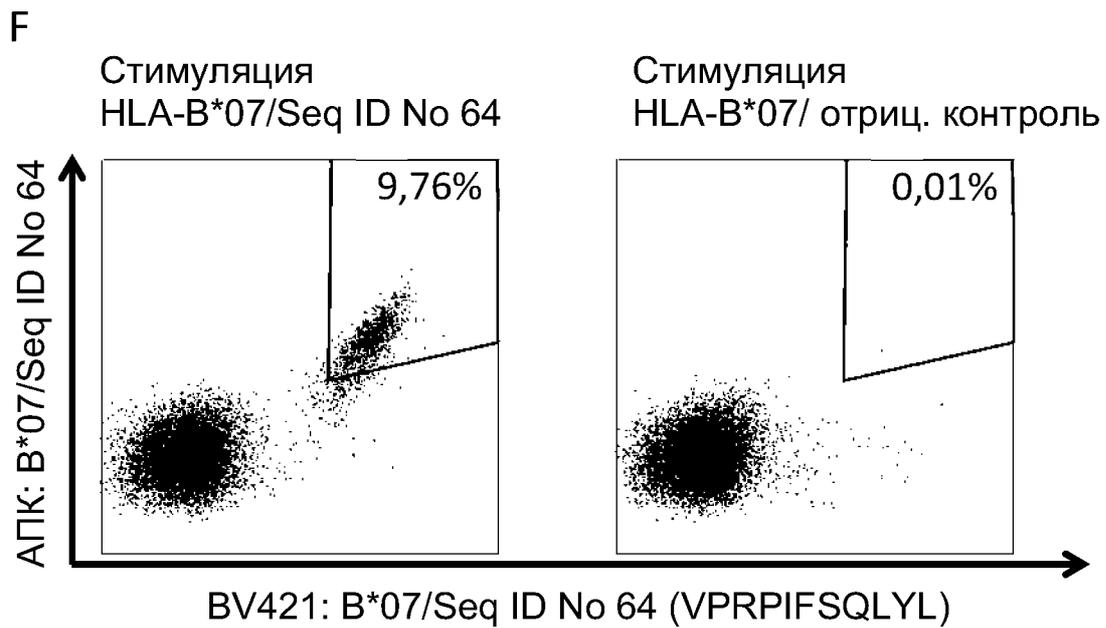
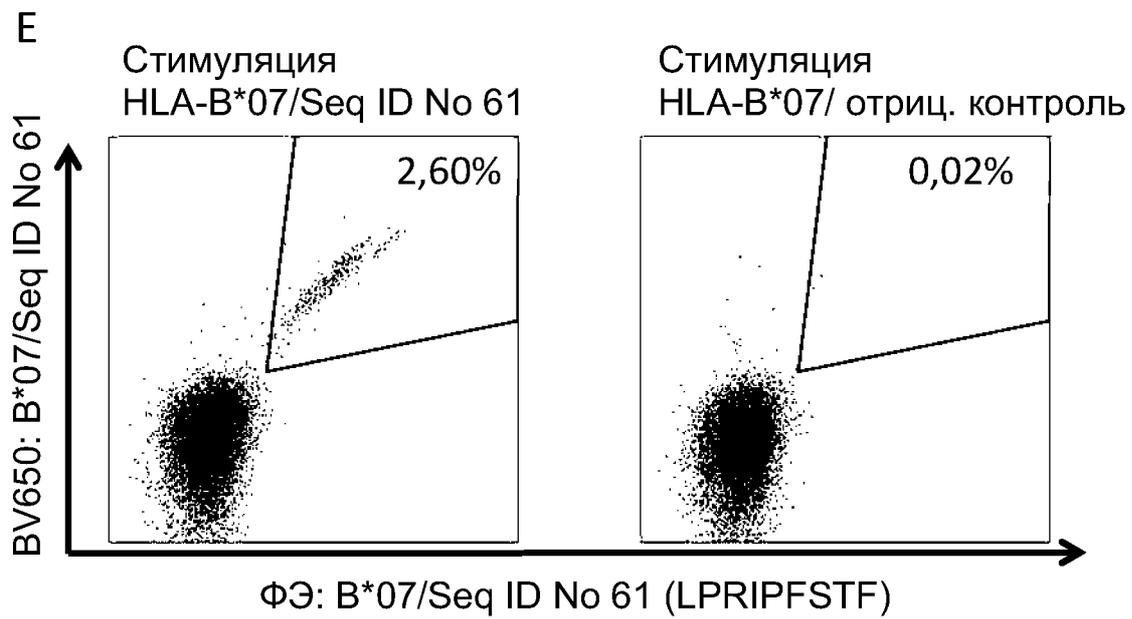
Фигура 3:



Фигура 3 (продолжение)



Фигура 3 (продолжение)



Фигура 3 (продолжение)

