

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190186** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.04.16

(22) Дата подачи заявки
2017.02.28

(51) Int. Cl. **A61K 39/00** (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)

**(54) ПЕПТИДЫ, КОМБИНАЦИИ ПЕПТИДОВ И МЕДИКАМЕНТЫ НА КЛЕТОЧНОЙ
ОСНОВЕ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ИММУНОТЕРАПИИ РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ И
ДРУГИХ ВИДОВ РАКА**

(31) 1603568.5; 62/302,010

(32) 2016.03.01

(33) GB; US

(62) 201891670; 2017.02.28

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

(72) Изобретатель:
**Мар Андреа, Вайншенк Тони, Сонг
Колетт, Шор Оливер, Фришце Дженс,
Сингх Харприт (DE)**

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

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

A1

202190186

202190186

A1

Пептиды, комбинации пептидов и медикаменты на клеточной основе для применения в иммунотерапии рака мочевого пузыря и других видов рака

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

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

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Наиболее распространенный вид рака мочевого пузыря развивается из уротелия или переходного эпителия, самого внутреннего слоя мочевого пузыря и называется: уротелиальная карцинома или переходно-клеточная карцинома (ПКК). Уротелиальные клетки расположены в других частях мочевыводящих путей, которые также могут быть инфильтрованы раковой опухолью у больных раком мочевого пузыря. Прогрессирующий рак мочевого пузыря далее прорастает в или

через другие слои в стенке мочевого пузыря, распространяется в первую очередь в лимфатические узлы, кости, легкие или печень (American Cancer Society, 2015).

Рак мочевого пузыря характеризуется его распространением и типом роста. В зависимости от его распространения рак мочевого пузыря подразделяется на неинвазивный и инвазивный тип. Неинвазивный или поверхностный рак мочевого пузыря локализован исключительно в самом внутреннем слое стенки мочевого пузыря. Напротив, рак мочевого пузыря инвазивного типа прорастает в более глубокие слои стенки мочевого пузыря (American Cancer Society, 2015).

В зависимости от вида роста рак мочевого пузыря подразделяется на папиллярные и плоские карциномы. Папиллярные карциномы растут в форме узких, пальцеобразных удлинений от внутренней стороны раковой опухоли мочевого пузыря к полному центру. Папиллярные карциномы зачастую не являются инвазивными. Очень медленно растущий неинвазивный папиллярный рак дополнительно классифицируется как папиллярное уротелиальное новообразование с низким потенциалом злокачественности (PUNLMP). Для таких опухолей в основном наблюдается очень хороший исход лечения. Плоские карциномы не прорастают к центру мочевого пузыря. Плоские карциномы мочевого пузыря, которые ограничены лишь внутренним слоем стенки мочевого пузыря, называются неинвазивными плоскими карциномами или плоскими карциномами *in situ* (CIS). Как папиллярные, так и плоские карциномы, которые впоследствии распространяются на более глубокие слои стенки мочевого пузыря, называются инвазивными уротелиальными (или переходно-клеточными) карциномами (American Cancer Society, 2015).

Другие виды рака, развивающиеся в мочевом пузыре, являются плоскоклеточными и мелкоклеточными карциномами, аденокарциномами и саркомами. Это редкие виды рака (American Cancer Society, 2015). Рак мочевого пузыря имеет 5 стадий. На 0-ой стадии, раковые клетки находятся только в пределах внутреннего слоя стенки мочевого пузыря. Рак мочевого пузыря на 0-ой стадии подразделяют на стадию 0a

в случае папиллярных карцином или на стадию 0is в случае плоских карцином. На следующих стадиях, I и II, происходит инфильтрация других слоев стенки мочевого пузыря раковыми клетками, и они распространяются в соединительную и мышечную ткань, соответственно. На III стадии клетки рака мочевого пузыря распространяются далее, из мочевого пузыря в окружающую жировую ткань или даже в органы репродуктивной системы. На IV стадии рак мочевого пузыря прорастает в стенку брюшной полости или таз, лимфатические узлы и затем распространяется в отдаленные органы, такие как легкие, кости или печень (National Cancer Institute, 2015).

В Соединенных Штатах рак мочевого пузыря находится на девятом месте среди наиболее частых причин летальных исходов от рака. Процентная доля летальных исходов, вызванных раком мочевого пузыря, возрастает с возрастом и достигает своего пика в возрасте 75–84 года. На долю рака мочевого пузыря приходится 4,5% всех новых случаев заболевания раком. Наиболее часто диагноз рака мочевого пузыря ставится людям в возрасте 65–84 года. Рак мочевого пузыря диагностируется примерно в 4 раза чаще у мужчин, чем у женщин. В течение последних 10 лет уровень новых случаев рака мочевого пузыря сокращался на 0,6% ежегодно, уровень смертности и 5-летней относительной выживаемости остается стабильным (SEER Stat facts, 2014).

В среднем уровень 5-летней относительной выживаемости для рака мочевого пузыря составляет около 77%. В основном, 5-летняя относительная выживаемость сильно зависит от стадии, когда был поставлен диагноз рака мочевого пузыря. 51% новых случаев рака мочевого пузыря были выявлены на очень ранней стадии *in situ*, когда рак мочевого пузыря локализован только в том слое стенки мочевого пузыря, в котором он возник. 5-летняя относительная выживаемость на этой стадии составляет около 96%. 35% новых случаев рака мочевого пузыря диагностируются на локализованной стадии. В этих случаях рак мочевого пузыря ограничен первичным очагом и 5-летняя относительная выживаемость составляет около 70%. 5-летняя относительная выживаемость для новых случаях рака мочевого пузыря,

при которых первичный диагноз был поставлен при наличии регионарных метастазов (рак распространился в лимфатические узлы, 7% всех новых случаев рака мочевого пузыря) и отдаленных метастазов (метастатический рак, 4% всех новых случаев рака мочевого пузыря), составляет 34 и 5,4%, соответственно. Стадия неизвестна в случае 3% новых диагнозов рака мочевого пузыря. В этих случаях 5-летняя относительная выживаемость составляет около 47% (SEER Stat facts, 2014).

Стандарт лечения рака мочевого пузыря включает хирургическую операцию, лучевую терапию, химиотерапию и иммунотерапию.

Для лечения рака мочевого пузыря могут проводиться следующие виды хирургических операций: трансуретральная резекция, радикальная или частичная цистэктомия и отведение мочи. В случае трансуретральной резекции раковую опухоль удаляют из внутренней стенки мочевого пузыря механически или при помощи выжигания опухоли высоковольтным электрическим током. В случае цистэктомии производят полное или частичное удаление мочевого пузыря вместе с любыми лимфатическими узлами и другими пораженными раком соседними органами. Отведение мочи – это вид хирургической операции, при которой прокладывают новые пути для хранения и выведения мочи. В дополнение к хирургической операции часто проводят химиотерапию, предназначенную для снижения риска рецидивирования рака (National Cancer Institute, 2015).

Лечение рака мочевого пузыря на 0 и I стадиях обычно производится с помощью трансуретральной резекции, после которой потенциально возможно проведение внутривезикулярной химиотерапии, которая – в качестве варианта – может комбинироваться с внутривезикулярной БЦЖ-иммунотерапией (*bacillus Calmette-Guérin*). Возможно проведение частичной или радикальной цистэктомии. Лечение рака мочевого пузыря на II и III стадии производится с помощью радикальной или частичной цистэктомии, трансуретральной резекции или внешней лучевой терапии в сочетании с химиотерапией или без нее. Способ лечения рака мочевого пузыря

на IV стадии зависит от степени распространения раковых клеток по организму. Если раковые клетки все еще находятся только в пределах мочевого пузыря, лечение рака можно производить с помощью химиотерапии в отдельности, радикальной цистэктомии или дистанционной лучевой терапии как в комбинации с химиотерапией, так и без нее. В случае распространения рака мочевого пузыря на другие части тела терапией первого выбора является химиотерапия в комбинации с хирургической операцией или без нее или лучевая терапия. В качестве паллиативной терапии на этой стадии может применяться дистанционная лучевая терапия, отведение мочи или цистэктомия. На любой стадии рака мочевого пузыря у пациентов имеется возможность участвовать в клинических исследованиях (National Cancer Institute, 2015).

Эффективный иммунотерапевтический подход зарекомендовал себя в лечении агрессивного немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря (НМИ РМП). По этому способу вводится ослабленная форма бактерий коровьей туберкулёзной палочки *Mycobacterium bovis* (*bacillus Calmette-Guérin* = БЦЖ) в виде раствора для внутрипузырного введения. Основной эффект от лечения БЦЖ – это значительная долгосрочная защита (вплоть до 10 лет) от рецидивов заболевания и снижение скорости прогрессирования. В принципе, лечение БЦЖ вызывает местную воспалительную реакцию, которая стимулирует клеточный иммунный ответ. Иммунный ответ на БЦЖ основан на следующих ключевых этапах: инфицирование БЦЖ уротелиальных и раковых клеток мочевого пузыря, за которым следует повышенная экспрессия антигенпрезентирующих молекул, индукция иммунного ответа, опосредованного высвобождением цитокинов, индукция противоопухолевой активности за счет привлечения различных иммунных клеток (помимо прочих, цитотоксических Т-лимфоцитов, нейтрофилов, естественных киллерных клеток и макрофагов) (Fuge et al., 2015; Gandhi et al., 2013).

БЦЖ-терапия, как правило, хорошо переносится пациентами, однако может привести и к летальному исходу, в особенности в случае пациентов с иммунодефицитом. БЦЖ-рефрактерные опухоли наблюдаются у около 30-40%

пациентов (Fuge et al., 2015; Steinberg et al., 2016a). Лечение пациентов, для которых БЦЖ-терапия оказалась неудачной, вызывает много трудностей. Для пациентов, БЦЖ-терапия для которых оказалась неудачной, существует высокий риск развития мышечно-инвазивного заболевания. Радикальная цистэктомия является предпочтительным вариантом лечения пациентов, не дающих ответ на терапию (Steinberg et al., 2016b; von Rundstedt and Lerner, 2015). Одобренной FDA терапией второй линии для пациентов с НМИ РМП, БЦЖ-терапия для которых оказалась неэффективной, и которые хотели бы сохранить мочевого пузырь, является химиотерапия препаратом валрубицин. Ряд других видов терапии второй линии имеется в распоряжении или сейчас проходит исследование, среди них такие иммунотерапевтические подходы как виды комбинированной терапии на основе БЦЖ-интерферона или БЦЖ-ингибитора контрольной точки, чрескожная вакцинация pre-БЦЖ, лечение комплексами MCNA нуклеиновой кислоты из *Mycobacterium phlei* клеточной стенки, моно- или комбинированная химиотерапия различными препаратами, например, митомицином С, гемцитабином, доцетакселом, наб-паклитакселом, эпирубицином, митомицином/гемцитабином, гемцитабином/доцетакселом, и химиотерапевтические препараты, вводимые с помощью аппаратов, например, термохимиотерапия, химиолучевая терапия, электрохимиотерапия или фотодинамическая терапия (Fuge et al., 2015; Steinberg et al., 2016b; von Rundstedt and Lerner, 2015). Все еще необходима дальнейшая оценка имеющихся видов терапии в клинических исследованиях.

В основном, лечение рака мочевого пузыря поздних стадий с распространением в мышечную ткань, известного как мышечно-инвазивный рак мочевого пузыря (MIBC) или метастатический рак мочевого пузыря, является сложным и остается по существу неизменным на протяжении нескольких последних десятилетий. Имеющиеся сейчас способы лечения прогрессирующего рака мочевого пузыря не обладают достаточной эффективностью. В новых тенденциях клинических подходов к лечению рака мочевого пузыря находит отражение недавно появившееся понимание генетических основ возникновения уротелиального рака. Здесь следует отметить недавнее внедрение предсказательных генетических и

молекулярных биомаркеров, направленное на улучшение ответа на лечение (Jones et al., 2016; Rouanne et al., 2016; Grivas et al., 2015; Azevedo et al., 2015; Knollman et al., 2015a).

До 2003 г. цистэктомия была единственным зарекомендовавшим себя стандартном лечения MIBC. Рецидивы рака на отдаленных участках тела после хирургической операции вызвали необходимость проведения неoadъювантной химиотерапии. Комбинированная высокодозная интенсивная химиотерапия на основе метотрексата, винбластина, доксорубицина и цисплатина (ускоренная схема MVAC или AMVAC) или гемцитабина и цисплатина (GC) считаются сейчас стандартом неoadъювантной терапии для лечения MIBC в США. Адъювантный способ применения химиотерапии в лечении MIBC ограничен высоким уровнем осложнений, связанных с хирургическим вмешательством, после радикальной цистэктомии. Тем не менее, сейчас рекомендуется применение схем AMVAC, GC или комбинации препаратов цисплатина, метотрексата и винбластина (CMV) в качестве адъювантной химиотерапии для пациентов группы высокого риска возникновения MIBC. Подобная системная химиотерапия применяется для лечения метастатического рака мочевого пузыря. В основном, лишь 30–40 % пациентов отвечают на химиотерапию на основе цисплатина. Кроме того, пациенты с нарушением функции почек не могут проходить лечение цисплатином. Вид лечения второй линии зависит от предшествовавшей терапии не может быть стандартизированным (Knollman et al., 2015b; Rouanne et al., 2016).

Альтернативные виды лечения рака мочевого пузыря поздних стадий исследуются в проводимых сейчас клинических испытаний. Актуальные клинические исследования сфокусированы на разработке молекулярно-таргетных видов терапии и иммунотерапии. В рамках таргетной терапии рака мочевого пузыря исследуется воздействие ингибиторов сигнального пути, связанного с онкогенезом (т. е. mTOR, рецепторов сосудистого эндотелиального, фибробластного или эпидермального фактора роста, ингибиторов анти-ангиогенеза или клеточного цикла). Разработка молекулярно-таргетных видов терапии по-прежнему связана со

сложностями в связи с высокой степенью генетического многообразия рака мочевого пузыря. Основным направлением существующей иммунотерапии является разработка препаратов, блокирующих контрольные точки, например, моноклональных антител к PD1 и адаптивный перенос Т-клеток (Knollman et al., 2015b; Grivas et al., 2015; Jones et al., 2016; Rouanne et al., 2016).

Принимая во внимание серьезные побочные эффекты и высокие расходы, связанные с лечением рака, существует необходимость идентифицировать факторы, которые могут быть использованы для лечения рака вообще и рака мочевого пузыря в частности. Также существует необходимость идентифицировать факторы, представляющие собой биомаркеры рака в целом и рака мочевого пузыря 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 раннее толерантность. Известными примерами ТАА этого класса являются Her-2/neu, сурвивин, теломераза или WT1.

г) Опухолеспецифические антигены: данные уникальные ТАА образуются в результате мутаций нормальных генов (таких как β -катенин, CDK4 и т. д.). Некоторые из этих молекулярных изменений ассоциированы с неопластической трансформацией и/или прогрессией. Опухолеспецифические антигены, в основном, способны индуцировать сильные иммунные ответы, не включая 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) (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 форма образует связывающую бороздку, которая используется для нековалентного взаимодействия с пептидами.

Молекулы МНС I класса встречаются на большинстве клеток, имеющих ядро. Они презентуют пептиды, образующиеся при протеолитическом расщеплении

преимущественно эндогенных белков, дефектных рибосомных продуктов (DRIP) и более крупных пептидов. Однако пептиды, образованные из эндосомальных компартментов или экзогенных источников, также часто встречаются на молекулах МНС I класса. Этот неклассический способ презентации I классом в литературе называется кросс-презентацией. (Brossart and Bevan, 1997; Rock et al., 1990). Молекулы МНС II класса могут встречаться преимущественно на профессиональных антигенпрезентирующих клетках (АПК) и, в первую очередь, презентировать пептиды экзогенных или трансмембранных белков, которые поглощаются АПК, например, во время эндоцитоза и впоследствии процессируются.

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

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

При отсутствии воспаления экспрессия молекул МНС II класса преимущественно ограничена клетками иммунной системы, в особенности профессиональными антигенпрезентирующими клетками (АПК), например, моноцитами, образованными из моноцитов клетками, макрофагами, дендритными клетками. Было обнаружено,

что опухолевые клетки больных раком пациентов экспрессируют молекулы МНС II класса (Dengjel et al., 2006).

Удлиненные (более длинные) пептиды по изобретению могут выполнять функцию активных эпитопов МНС II класса.

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

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

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

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

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

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

Для того чтобы белки были распознаны Т-лимфоцитами в качестве опухолеспецифических или –ассоциированных антигенов, и чтобы они могли использоваться в терапии, должны выполняться особые предварительные требования. Антиген должен экспрессироваться преимущественно опухолевыми клетками и не экспрессироваться или экспрессироваться в сравнительно малом количестве здоровыми тканями. В предпочтительном варианте осуществления пептид должен избыточно презентироваться опухолевыми клетками по сравнению

с нормальными здоровыми тканями. Кроме того, желательно, чтобы соответствующий антиген не только присутствовал в каком-либо виде опухоли, но и также имел высокую концентрацию (т. е. несколько копий соответствующего пептида на клетку). Опухолеспецифические и опухолеассоциированные антигены часто образованы из белков, напрямую задействованных в трансформации нормальной клетки в опухолевую, в связи с их функцией, например, при контроле клеточного цикла или подавлении апоптоза. Кроме того, нисходящие мишени белков, напрямую являющихся причиной трансформации, могут быть представлены в повышенном количестве и, таким образом, быть косвенно опухолеассоциированными. Такие косвенно опухолеассоциированные антигены могут также быть мишенями вакцинационного подхода (Singh-Jasuja et al., 2004). Необходимо, чтобы эпитопы присутствовали в аминокислотной последовательности антигена, чтобы гарантировать, что такой пептид («иммуногенный пептид»), образованный из опухолеассоциированного антигена, ведет к Т-клеточному ответу *in vitro* или *in vivo*.

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

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

линиях или же селективно экспрессированных в таких тканях или клеточных линиях, не дает точной информации об использовании антигенов, транскрибированных с данных генов, в иммунотерапии. Это обусловлено тем, что только отдельная субпопуляция эпитопов этих антигенов подходит для такого применения, так как Т-клетка с соответствующим ТКР должна быть в наличии, и необходимо, чтобы отсутствовала или была минимальной иммунологическая толерантность к этому конкретному эпитопу. Поэтому в наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения важно выбрать только те пептиды, презентруемые в избытке или селективно, против которых может быть обнаружена функциональная и/или пролиферирующая Т-клетка. Такая функциональная Т-клетка определяется как Т-клетка, которая при стимуляции специфическим антигеном может быть распространена посредством клонирования и способна к выполнению эффекторных функций («эффекторная Т-клетка»).

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

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В первом аспекте настоящее изобретение относится к пептиду, включающему аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 149, 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: 149, где указанный вариант связывается с МНС и/или индуцирует Т-клеточную перекрестную реакцию с указанным пептидом, или его фармацевтически приемлемой соли, где указанный пептид не является базовым полипептидом полной длины.

Настоящее изобретение относится далее к пептиду по настоящему изобретению, включающему последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO 149, 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 149, где указанный пептид или его вариант обладает общей длиной, составляющей 8–100, предпочтительно 8–30 и, наиболее предпочтительно, 8–14 аминокислот.

В последующих таблицах представлены пептиды в соответствии с настоящим изобретением, соответствующие им SEQ ID NO и потенциальные исходные (лежащие в основе) гены для данных пептидов. Все пептиды Таблицы 1 и Таблицы 2 связываются с HLA-A*02. Пептиды Таблицы 2 были раскрыты ранее, но ранее они вообще не ассоциировались с раком. Пептиды из Таблицы 3 являются дополнительными пептидами, которые могут быть полезны в комбинации с другими пептидами по изобретению. Пептиды из Таблицы 4 далее полезны для постановки диагноза и/или лечения различных других злокачественных заболеваний, которые включают избыточную экспрессию или избыточную презентацию соответствующего базового полипептида.

Таблица 1: Пептиды в соответствии с настоящим изобретением. J = фосфосерин,
U = фосфотреонин

SEQ ID No	Последовательность	Ид. № гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
1	ILLQASVQV	56649	TMPRSS4
2	GLLKAYSIRTA	3855	KRT7
3	YLDEIPPKFSM	4070	TACSTD2
4	SLDVVNLLV	57182	ANKRD50
5	IQDPVIFYV	57211	GPR126
6	SIVDFLITA	10848	PPP1R13L
7	QMFEGQILDV	55057	AIM1L
8	ALSFSSSAGPGLLKA	3855	KRT7
9	SLVDARFQL	130497	OSR1
10	GLWHGMFANV	57609	DIP2B
11	AMAELRVVV	126410	CYP4F22
12	GVALTVTGV	2319	FLOT2
13	FLEEKEQAAL	10626, 147166, 374286	TRIM16, CDRT1, TRIM16L
14	GLAGPVRGV	6628, 6638, 8926	SNURF, SNRPB, SNRPN
15	YLAPENGYLMEA	6625	SNRNP70
16	ILGPQGNTI	10657	KHDRBS1
17	RLSQLEGVNV	55737	VPS35
18	SIAAYNPVV	10202	DHRS2
19	SLATTLTKI	1315	COPB1
20	YLPDSLTLQL	55227	LRRC1
21	TLIEDDALNGA	3248	HPGD
22	SIAKEGVVGA	6623	SNCG
23	YTLSTEFL	6282	S100A11
24	SLLGGITVV	9043	SPAG9
25	SLDSSGFSL	143	PARP4
26	GLALLYSGV	533	ATP6V0B
27	STTNGGILTV	84248	FYTDD1
28	GLIDSLMAYV	5317	PKP1
29	ALSSPPPTV	9372	ZFYVE9
30	ILDISRSEV	57720	GPR107
31	SLFDGIATGL	1788	DNMT3A
32	YQAPDIDVQL	29997	GLTSCR2
33	VLFGEITRL	4720	NDUFS2
34	ALLDEQQVNV	3397	ID1
35	KLPEPPPLA	2086	ERV3-1
36	ALWDEFNQL	6899	TBX1
37	ILSAILVHL	339766	MROH2A
38	TLTSIIVAV	339766	MROH2A

39	AMASHLTST	100526737, 10432, 5936	RBM4
40	VIADRVVTV	127731	VWA5B1
41	FLDDGNQMLL	79659	DYNC2H1
42	FLIDASQRV	256076	COL6A5
43	FLIESKLLSL	92749	DRC1
44	GLAQDPKSLQL	23331	TTC28
45	IIDSSPTAL	79915	ATAD5
46	SLFIGAEIVAV	405753	DUOXA2
47	VLMDDTDPL	5700	PSMC1
48	VLMDDTDPLV	5700	PSMC1
49	SLIGGTNFV	162	AP1B1
50	VLANRVAVV	10202	DHRS2
51	ALLDKAQINL	147711, 26974	ZNF285
52	SLATLEGIQL	7776	ZNF236
53	ILVQVIPVV	3664	IRF6
54	ALNDEINFL	3855	KRT7
55	KLLETKWTL	3855	KRT7
56	ILLRDLPTL	400451	FAM174B
57	GLAHFVNEI	7750	ZMYM2
58	GLDSSSVNVQGSVL	9589	WTAP
59	WLSTSIPEA	2194	FASN
60	SLSDVRVIV	57186	RALGAPA2
61	VLLDNLPGV	27152	INTU
62	GQLDFSEFL	6282	S100A11
63	LLAGLLVGV	54991	C1orf159
64	GLLSQGSPL	2729	GCLC
65	IITDLLRSV	8880	FUBP1
66	SLWEENQAL	3911	LAMA5
67	FLTPPLLSV	160	AP2A1
68	TMIVSLAAV	23204	ARL6IP1
69	QIWDKILSV	10202	DHRS2
70	KLAEISLGV	1830	DSG3
71	LLSEDFVSV	64847	SPATA20
72	SLFTGLRSI	50506, 53905	DUOX2, DUOX1
73	VLKVFLENV	121504, 554313, 8294, 8359, 8360, 8361, 8362, 8363, 8364, 8365, 8366, 8367, 8368, 8370	HIST1H4D, HIST1H4J, HIST2H4B, HIST1H4L, HIST1H4H, HIST1H4K, HIST1H4A, HIST2H4A, HIST1H4B, HIST1H4I, HIST4H4, HIST1H4E, HIST1H4C, HIST1H4F

74	LLQEGEVYSA	10594	PRPF8
75	RVISSVISV	64123	ELTD1
76	AVVSSVNTV	6623	SNCG
77	KVFGGFQVV	3280	HES1
78	FIPDFAVAI	1293	COL6A3
79	FLDPATPRV	7050	TGIF1
80	ILLDTPLFLL	253190, 94009	SERHL2
81	SLDKGTLYI	79887	PLBD1
82	NLHNSYYSV	901	CCNG2
83	VILDKYYFL	56649	TMPRSS4
84	ALDPASISV	54165	DCUN1D1
85	HLLDSKVPSV	3691	ITGB4
86	FLIJLIISV	50835	TAS2R9
87	RLLELLQEA	150696	PROM2
88	ALASLENHV	51592	TRIM33
89	YLPETEFI	6926	TBX3
90	GMTELYFQL	5591	PRKDC
91	NLDAATYQV	23443	SLC35A3
92	ALLDEQQNVLL	3397	ID1
93	LLDLIQTKV	162, 163	AP2B1, AP1B1
94	ALADGVPVAL	91056	AP5B1
95	YLIGQHVTA	23014	FBXO21
96	KLTNGIWWL	162	AP1B1
97	TVGPGLLG	7450	VWF
98	YLIGLDPENLAL	54677	CROT
99	ALIGDDVGL	55421	C17orf85
100	SLQSFHGV	79905	TMC7
101	ILDEMRAQL	4940	OAS3
102	GLYEGLDWL	373, 375, 377, 378	ARF3, TRIM23, ARF1, ARF4
103	GLYSGEVLV	89891	WDR34
104	NAVVELVTV	10159	ATP6AP2
105	TLFPSKIGV	55233, 92597	MOB1A, MOB1B
106	ILLDTPLFL	253190, 94009	SERHL2
107	LULAKLEKV	51531	C9orf156
108	YLDPNQRDL	126231	ZNF573

Таблица 2: Дополнительные пептиды в соответствии с настоящим изобретением

SEQ ID No	Последовательность	Ид. № гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
109	RLIDDMVAQA	3417	IDH1
110	VLFNIDGQGNHV	2625	GATA3

SEQ ID No	Последовательность	Ид. № гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
111	LLDVTPKAV	9414	TJP2
112	YLDPSLNSL	55086	CXorf57
113	FVFEPPTGV	1778	DYNC1H1
114	IITKDLFQV	1778	DYNC1H1
115	SLLDFERSL	84343	HPS3
116	QLAWFDTDL	1499	CTNNB1
117	YMLDIFHEVL	3038	HAS3
118	RLLDFPTLLV	54627	MAP10
119	SLDEKQNLV	79828	METTL8
120	IIPEIQKV	1434	CSE1L
121	QLQGYLRSV	6128	RPL6
122	ILEPSLYTV	22818	COPZ1
123	NLAGVYSEV	4733	DRG1
124	QIDGTLSTI	100307126, 128866, 55030, 92421	FBXO34, CHMP4C, CHMP4B, CHMP4BP1
125	VLDEGSASV	1844	DUSP2
126	SLLRVGWSV	221092, 26580	BSCL2, HNRNPUL2
127	KLNATNIEL	5686	PSMA5
128	KLWGQSIQL	54823	SWT1
129	YLEPKLTQV	23198	PSME4
130	TLTSKLYSL	29796	UQCR10
131	ILTSIQSLL	7319, 7320	UBE2A, UBE2B
132	YILEGEPGKV	6730	SRP68
133	GLDPLGYEIQL	57122	NUP107
134	IVAPGTFEV	3608	ILF2
135	FLLPLIIVL	3140	MR1
136	GLSEPIFQL	55669	MFN1
137	ALFPHLLQPVL	1434	CSE1L
138	YLTNEGIQYL	100529239, 6204	RPS10-NUDT3, RPS10
139	LLYPTEITV	3675	ITGA3
140	ALLDGRVQL	375790	AGRN
141	SMFGAGLTV	533	ATP6V0B
142	FLGENISNFL	8542	APOL1
143	TLVTGLASV	55669	MFN1
144	YLAGAPTL	7407	VAR5
145	ALYPGQLVQL	64333	ARHGAP9
146	YLARIQGFQV	27067	STAU2
147	QMLELITRL	23405	DICER1
148	TLGVIPESV	84196	USP48

SEQ ID No	Последовательность	Ид. № гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
149	VLLRVLILL	102	ADAM10

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

SEQ ID No	Последовательность	Ид. № гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
150	SLFGQDVKAV	26036	ZNF451
151	SLAEEKLQASV	2194	FASN
152	RLLDVLAPLV	80781	COL18A1
153	GLLDPNVKSIFV	79033	ERI3
154	ILNVDGLIGV	47	ACLY
155	VLSSGLTAA	1459	CSNK2A2
156	KLVEFDLGA	10460	TACC3
157	KLLDTMVDFTL	100527963, 11243	PMF1-BGLAP, PMF1
158	ILADTFIGV	222223	KIAA1324L
159	SLIEDLILL	64754	SMYD3
160	SLLGGNIRL	2181	ACSL3
161	YLLEKFVAV	1663, 440081, 642846	DDX11, DDX12P
162	TLLAAEFLKQV	100288772, 10574	CCT7P2, CCT7
163	LLLEEGGLVQV	7353	UFD1L
164	ALADLTGTVV	23385	NCSTN
165	RLPDIPLRQV	55656	INTS8
166	YLEPYLKEV	727947, 7381	UQCRB
167	SLWGGDVVL	157680	VPS13B
168	LTAPPEALLMV	79050	NOC4L
169	LLIDDEYKV	23065	EMC1
170	GLIEIISNA	23020	SNRNP200
171	ALPTVLVGV	5351	PLOD1
172	LLYGHTVTV	347734	SLC35B2
173	FVFSFPVSV	1846	DUSP4
174	SLLEKELESV	1819	DRG2
175	FIQLITGV	477, 478	ATP1A2, ATP1A3
176	SMSGYDQVL	3187, 3188	HNRNPH1, HNRNPH2
177	NLLQVLEKV	144501	KRT80
178	ALNEEAGRLLL	27338	UBE2S
179	TLGQIWDV	1778	DYNC1H1
180	GVIAEILRGV	10528	NOP56
181	YLGEGRMV	5704	PSMC4

SEQ ID No	Последовательность	Ид. № гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
182	YLAPFLRNV	23019	CNOT1
183	YVFPGVTRL	84221	SPATC1L
184	LMTKEISSV	5591	PRKDC
185	GLSNLGIKSI	122553	TRAPPC6B
186	VLYPHEPTAV	29980, 5523	DONSON, PPP2R3A
187	KLGAVFNQV	23450	SF3B3
188	KLFNEFIQL	10885	WDR3
189	ALLRTVVSV	2590	GALNT2
190	LLFPHPVNQV	8518	IKBKAP
191	VLFQEALWHV	2194	FASN
192	ALNPADITV	51497	TH1L
193	ALVQDLAKA	891	CCNB1
194	SLLSHQVLL	57221	KIAA1244
195	ATLNIIHSV	51542	VPS54
196	LLHEENFSV	6942	TCF20
197	LLLPDYLV	27044	SND1
198	NLIEKSIYL	667	DST
199	ALANQKLYSV	23195	MDN1
200	YLVNQVKEL	10051	SMC4
201	KLLDEVTYLEA	1573	CYP2J2
202	TLITDGMRSV	29894	CPSF1
203	FLIPYAIML	11254	SLC6A14
204	GVYDGEESV	4113	MAGEB2
205	KIVDFSYSV	701	BUB1B

Настоящее изобретение относится также в общем к пептидам в соответствии с настоящим изобретением для применения при лечении пролиферативных заболеваний, например, острого миелогенного лейкоза (ОМЛ), рака молочной железы, рака желчных протоков, рака головного мозга, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), колоректальной карциномы, рака пищевода, рака желчного пузыря, рака желудка, гепатоклеточного рака (ГКК), карциномы клеток Меркеля, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечноклеточного рака, мелкоклеточного рака легких (МРЛ) и рака матки.

Особенно предпочтительными являются пептиды – в отдельности или в комбинации – в соответствии с настоящим изобретением, выбранные из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 149. Более предпочтительными являются пептиды – в отдельности или в комбинации – выбранные из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 48 (см. Таблицу 1), и их применение в иммунотерапии рака мочевого пузыря, острого миелогенного лейкоза (ОМЛ), рака молочной железы, рака желчных протоков, рака головного мозга, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), колоректальной карциномы, рака пищевода, рака желчного пузыря, рака желудка, гепатоклеточного рака (ГКК), карциномы клеток Меркеля, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечноклеточного рака, мелкоклеточного рака легких (МРЛ) и рака матки и, предпочтительно, рака мочевого пузыря.

Как показано в последующей Таблице 4, многие из пептидов в соответствии с настоящим изобретением присутствуют в других видах опухолей и могут, таким образом, применяться в иммунотерапии при других показаниях. См. также Фигуру 1 и Пример 1.

Таблица 4: Пептиды в соответствии с настоящим изобретением и их конкретное применение при других пролиферативных заболеваниях, в особенности при других раковых заболеваниях. Для выбранных пептидов таблица демонстрирует, на каких дополнительных видах опухолей они были обнаружены и имели либо избыточную презентацию на более чем 5% исследованных опухолевых образцов, либо презентацию на более чем 5% исследованных опухолевых образцов с соотношением среднего геометрического для опухоли и для нормальных тканей, составляющим более трех. Избыточная презентация определяется как более высокая представленность на опухолевом образце по сравнению с образцом нормальной ткани с наивысшей презентацией. Нормальными тканями, на основе которых проводили испытание на избыточную презентацию, были: жировая ткань,

ткань надпочечной железы, клетки крови, кровеносные сосуды, ткань костного мозга, головного мозга, ткань пищевода, глаз, желчного пузыря, сердца, почек, толстой кишки, печени, легких, лимфатических узлов, нервная ткань, ткань поджелудочной железы, паращитовидной железы, брюшины, гипофиза, плевры, слюнной железы, скелетных мышц, кожа, ткань тонкой кишки, селезенки, желудка, вилочковой железы, щитовидной железы, трахеи, мочеточника и мочевого пузыря. НМРЛ= немелкоклеточный рак легких, МРЛ= мелкоклеточный рак легких, ПКК= рак почки, КРК= рак толстого или прямого кишечника, РЖ= рак желудка, ГКК= рак печени, РПЖ= рак поджелудочной железы, РПрЖ= рак предстательной железы, РМЖ= рак молочной железы, ККМ= карцинома клеток Меркеля, РЯ= рак яичника, НХЛ= неходжкинская лимфома, ОМЛ= острый миелогенный лейкоз, ХЛЛ= хронический лимфатический лейкоз.

SEQ ID No.	Последовательность	Другие релевантные органы / заболевания
1	ILLQASVQV	РПЖ, рак пищевода, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, ПлККГШ
2	GLLKAYSIRTA	НМРЛ, РМЖ, рак пищевода, рак матки
3	YLDEIPPKFSM	РПрЖ, рак матки
4	SLDVVNLLV	КРК, НХЛ, ОМЛ, РМЖ, меланома, рак матки, ПлККГШ
5	IQDPVIFYV	НХЛ, рак матки
6	SIVDFLITA	Рак матки, ПлККГШ
7	QMFEGQILDV	МРЛ, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, ПлККГШ
9	SLVDARFQL	РПрЖ
10	GLWHGMFANV	НМРЛ, МРЛ, КРК, ГКК, ОМЛ, РЯ, рак головного мозга, ПлККГШ
11	AMAELRVVV	ГКК, РМЖ, ПлККГШ
12	GVALTVTGV	ХЛЛ, ПКК, РЖ, ГКК, НХЛ
13	FLEEKEQAAL	НМРЛ, ПлККГШ
14	GLAGPVRGV	ОМЛ, меланома, ГКК
15	YLAPENGYLMEA	МРЛ, КРК, ГКК, РПрЖ, НХЛ, ОМЛ, меланома, рак матки, НМРЛ, ПлККГШ
16	ILGPQGNTI	ХЛЛ, НХЛ, ОМЛ, меланома, рак матки
17	RLSQLEGVNV	НМРЛ, МРЛ, ПКК, ГКК, меланома, рак матки, РЯ, ПлККГШ
18	SIAAYNPVV	РПЖ, НХЛ
20	YLPDSLTLQL	Меланома, рак матки, ГКК

SEQ ID No.	Последовательность	Другие релевантные органы / заболевания
21	TLIEDDALNGA	Меланома, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
23	YTLSKTEFL	Меланома, РЯ, рак матки, НМРЛ, ПКК, РЖ, ГКК, НХЛ
24	SLLGGITVV	Меланома, рак головного мозга, рак матки
25	SLDSSGFSL	ХЛЛ, меланома
26	GLALLYSGV	ХЛЛ, ОМЛ, РМЖ, меланома, рак матки, ГКК
27	STTNGGILTV	РМЖ
28	GLIDSLMAYV	НМРЛ, НХЛ, меланома, рак пищевода, ПлККГШ
29	ALSSPPPTV	Рак головного мозга, рак пищевода, ПлККГШ
30	ILDISRSEV	ГКК, РПЖ, рак матки
31	SLFDGIATGL	Рак головного мозга, ГКК, ОМЛ, меланома, рак матки
32	YQAPDIDVQL	РЖ, ХЛЛ, НХЛ, меланома
33	VLFGEITRL	ГКК, НХЛ, ОМЛ
34	ALLDEQQVNV	ПКК, рак пищевода, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, рак головного мозга, ПлККГШ
35	KLPEPPPLA	Рак матки
39	AMASHLTST	ГКК
41	FLDDGNQMLL	Меланома, ПлККГШ
45	IIDSSPTAL	ГКК, меланома, рак матки
46	SLFIGAEIVAV	КРК
49	SLIGGTNFV	ОМЛ, РМЖ, меланома
50	VLANRVAVV	НХЛ
51	ALLDKAQINL	МРЛ, РЯ
53	ILVQVIPVV	НМРЛ, МРЛ, РПЖ, РМЖ, рак пищевода, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, ПлККГШ
55	KLLETKWTL	РЯ, НМРЛ
56	ILLRDLPTL	ГКК, РПРЖ, НХЛ, РМЖ, РЯ, рак матки
57	GLAHFVNEI	НМРЛ, МРЛ, рак мочевого пузыря, КРК, ГКК, РПРЖ, НХЛ, ОМЛ, РМЖ, меланома, рак матки
58	GLDSSVNVQGSVL	НМРЛ, ГКК, НХЛ, меланома, РЯ, рак матки
59	WLSTSIPEA	МРЛ, ПКК, КРК, ГКК, ХЛЛ, НХЛ, ОМЛ, РМЖ, меланома, РЯ, рак матки, ПлККГШ
60	SLSDVRVIV	КРК, ГКК, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
61	VLLDNLPGV	МРЛ, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
62	GQLDFSEFL	Рак головного мозга, меланома

SEQ ID No.	Последовательность	Другие релевантные органы / заболевания
63	LLAGLLVGV	МРЛ
64	GLLSQGSPL	ПлККГШ
65	IITDLLRSV	РПЖ, ХЛЛ, НХЛ, ОМЛ, меланома, РЯ
66	SLWEENQAL	РМЖ, рак пищевода, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
67	FLTPPLLSV	Рак головного мозга, ГКК, РПрЖ, ОМЛ, РМЖ, меланома, рак пищевода, рак матки
68	TMIVSLAAV	НМРЛ, МРЛ, рак головного мозга, КРК, НХЛ, ОМЛ, РМЖ, меланома, рак матки, ПлККГШ
69	QIWDKILSV	РПЖ, НХЛ
70	KLAEISLGV	НМРЛ, РМЖ, рак пищевода, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, ПлККГШ
71	LLSEDFVSV	РМЖ, меланома, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
73	VLKVFLENV	РЖ, РПЖ, ОМЛ, меланома, ГКК, ХЛЛ, НХЛ
74	LLQEGEVYSA	КРК, ГКК, ХЛЛ, НХЛ, ОМЛ, РМЖ, ККМ, меланома, рак пищевода, РЯ, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
77	KVFGGFQVV	НМРЛ, МРЛ, рак головного мозга, РПрЖ, ПКК
78	FIPDFAVAI	НМРЛ, МРЛ, РЖ, РМЖ, НХЛ
79	FLDPATPRV	НМРЛ, ХЛЛ, НХЛ, ОМЛ, меланома, рак пищевода, РЯ, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, ПлККГШ
80	ILLDTPLFLL	ХЛЛ, ОМЛ, РМЖ
83	VILDKYYFL	КРК, рак пищевода, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, РПЖ, ПлККГШ
84	ALDPASISV	ГКК, меланома, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, НМРЛ, РМЖ, ПлККГШ
85	HLLDSKVPSV	НМРЛ, МРЛ, ГКК, рак пищевода, ПлККГШ
87	RLLELLQEA	РМЖ, рак пищевода, РЯ, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, ПлККГШ
89	YLFPETEFI	ГКК, РПрЖ
90	GMTELYFQL	РПЖ, ПлККГШ
91	NLDAATYQV	КРК, ГКК, РМЖ, рак матки
92	ALLDEQQVNVLL	ПКК, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, ПлККГШ
93	LLDLIQTKV	МРЛ, ХЛЛ, НХЛ, меланома, РЯ
94	ALADGVPVAL	ОМЛ, меланома, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
95	YLIGQHVTA	ПКК, меланома, РЯ, рак матки, ПлККГШ
96	KLTNGIWVL	ОМЛ, меланома, НМРЛ

SEQ ID No.	Последовательность	Другие релевантные органы / заболевания
97	TVGPGLLGV	ПКК, рак головного мозга, ГКК, меланома, рак матки
98	YLIGLDPENLAL	Рак головного мозга, ГКК, ПлККГШ
99	ALIGDDVGL	КРК, ХЛЛ, НХЛ, ОМЛ, меланома, НМРЛ
100	SLQSFIHGV	Рак головного мозга, КРК
101	ILDEMRAQL	РМЖ, меланома, рак пищевода, рак матки, ПлККГШ
102	GLYEGLDWL	РПЖ, ОМЛ
103	GLYSGEVLV	РМЖ, ОМЛ
104	NAVVELVTV	РЖ, РПЖ
105	TLFPSKIGV	Рак матки
106	ILLDTPLFL	ГКК, РМЖ, ОМЛ
108	YLDPNQRDL	Рак головного мозга, меланома
109	RLIDDMVAQA	Рак желчного пузыря, рак желчных протоков
110	VLFNIDGQGNHV	РМЖ, меланома
111	LLDVTPKAV	Рак головного мозга, НХЛ, меланома, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, ПлККГШ
112	YLDPSLNSL	Рак головного мозга
113	FVFEPPPGV	НХЛ, РМЖ, меланома, ПлККГШ
114	IITKDLFQV	Рак матки, меланома
115	SLLDFERSL	ГКК, РМЖ, меланома
116	QLAWFDTDL	ПКК, КРК, ГКК, РМЖ, РЯ, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
117	YMLDIFHEVL	ПлККГШ
118	RLLDFPTLLV	ОМЛ, РЯ
119	SLDEKQNLV	ПлККГШ
120	IIPEIQKV	РЖ, РПЖ
121	QLQGYLRVSV	МРЛ, КРК, ГКК, НХЛ, рак пищевода, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, ПлККГШ
122	ILEPSLYTV	НМРЛ, РЖ, КРК, ГКК, РПЖ, РПрЖ, НХЛ, ОМЛ, РМЖ, меланома, рак пищевода, РЯ, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, рак головного мозга, ПлККГШ
123	NLAGVYSEV	Меланома, рак пищевода, рак матки
124	QIDGTLSTI	ОМЛ, рак головного мозга
125	VLDEGSASV	КРК, НХЛ, рак пищевода, ХЛЛ
126	SLLRVGWSV	НМРЛ, МРЛ, рак головного мозга, РЖ, ГКК, РПрЖ, ХЛЛ, НХЛ, ОМЛ, меланома, РЯ, ПлККГШ

SEQ ID No.	Последовательность	Другие релевантные органы / заболевания
127	KLNATNIEL	РМЖ, рак пищевода
128	KLWGQSIQL	НХЛ, ОМЛ, рак пищевода, ПлККГШ
129	YLEPKLTQV	НМРЛ, МРЛ, ГКК, ОМЛ, меланома, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, ПлККГШ
131	ILTSIQSLL	ХЛЛ, НХЛ, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, ГКК, ОМЛ, ПлККГШ
132	YILEGEPGKV	МРЛ, меланома, рак пищевода, ГКК, ПлККГШ
133	GLDPLGYEIQ	МРЛ, ПКК, ХЛЛ, НХЛ, ОМЛ, РМЖ, РЯ, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, ПлККГШ
134	IVAPGTFEV	ПКК, рак головного мозга, ГКК, ХЛЛ, НХЛ, ОМЛ, РМЖ, меланома, рак пищевода, рак матки, РЖ
135	FLLPLIIVL	НХЛ, РПРЖ, ХЛЛ, меланома, ОМЛ, ПлККГШ
136	GLSEPIFQL	Меланома
137	ALFPHLLQPV	НМРЛ, МРЛ, ПКК, ГКК, ХЛЛ, ККМ, меланома, РЯ, РПЖ, РПРЖ, ПлККГШ
138	YLTNEGIQYL	МРЛ, ХЛЛ, НХЛ, меланома, рак пищевода, РЯ, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, НМРЛ, ПлККГШ
139	LLYPTEITV	ПКК, меланома, рак пищевода, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, ПлККГШ
140	ALLDGRVQL	НМРЛ, МРЛ, ПКК, рак головного мозга, РЖ, КРК, ГКК, РПЖ, РПРЖ, ХЛЛ, ОМЛ, РМЖ, меланома, рак пищевода, РЯ, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
141	SMFGAGLTV	РЖ, ГКК, РПЖ, ОМЛ, РМЖ, меланома
142	FLGENISNFL	НМРЛ, МРЛ, РЖ, РПЖ, меланома, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, ПлККГШ
143	TLVTGLASV	МРЛ, ХЛЛ, НХЛ, РМЖ, меланома, РЯ, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, ПлККГШ
144	YLAGAAPT	ГКК, ХЛЛ, НХЛ, ОМЛ, меланома, рак матки, ПлККГШ
145	ALYPGQLVQL	ХЛЛ, ОМЛ, НХЛ
146	YLARIQGFQV	РЯ, ОМЛ, НХЛ
147	QMLELITRL	ХЛЛ, меланома, ОМЛ, НХЛ
148	TLGVIPESV	МРЛ, рак головного мозга, ХЛЛ, меланома, РЯ, рак пищевода, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, ОМЛ, НХЛ, ПлККГШ

SEQ ID No.	Последовательность	Другие релевантные органы / заболевания
149	VLLRVLILL	РПЖ, ХЛЛ, РМЖ, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID NO: 1, 7, 21, 34, 53, 60, 61, 66, 70, 74, 79, 83, 84, 87, 92, 109, 111, 116, 121, 122, 129, 138, 139, 140, 142, 143, 148, и 149 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения рака желчного пузыря и/или рака желчных протоков.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID No. 2, 4, 11, 26, 27, 49, 53, 57, 59, 66, 67, 68, 70, 74, 78, 80, 84, 87, 101, 103, 106, 110, 113, 115, 116, 122, 127, 133, 134, 140, 141, 143, и 149 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения РМЖ.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID No. 4, 14, 15, 16, 17, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 28, 31, 32, 41, 45, 49, 57, 58, 59, 62, 65, 67, 68, 71, 73, 74, 79, 84, 93, 94, 95, 96, 97, 99, 101, 108, 110, 111, 113, 114, 115, 122, 123, 126, 129, 132, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 147, и 148 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения меланомы.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID No. 1, 18, 30, 53, 65, 69, 73, 83, 90, 102, 104, 120, 122, 137, 140, 141, 142, и 149 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения РПЖ.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID No. 1, 2, 28, 29, 34, 53, 66, 67, 70, 74, 79, 83, 85, 86, 101, 121, 122, 123, 125, 127, 128, 132, 134, 138, 139, 140, и 148 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения рака пищевода.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID No. 1, 3, 4, 5, 6, 7, 15, 16, 17, 20, 23, 24, 26, 30, 31, 34, 35, 45, 53, 56, 57, 58, 59, 66, 67, 68, 71, 74, 83, 91, 94, 95, 97, 101, 105, 111, 114, 116, 121, 122, 123, 131, 133, 134, 140, 142, 143, 144, 148, и 149 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения рака матки.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID No. 2, 10, 13, 15, 17, 23, 28, 53, 55, 57, 58, 68, 70, 77, 78, 79, 84, 85, 96, 99, 122, 126, 129, 137, 138, 140, и 142 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения НМРЛ.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID No. 10, 24, 29, 30, 34, 57, 62, 67, 68, 77, 97, 98, 100, 108, 111, 112, 122, 124, 126, 134, 140, и 148 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения рака головного мозга.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID No. 4, 5, 12, 15, 16, 18, 23, 28, 32, 33, 50, 56, 57,

58, 59, 65, 68, 69, 73, 74, 78, 79, 93, 99, 111, 113, 121, 122, 125, 126, 128, 131, 133, 134, 135, 138, 143, 144, 145, 146, 147, и 148 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения НХЛ.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID No. 4, 10, 15, 46, 57, 59, 60, 68, 91, 99, 100, 116, 121, и 122 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения КРК.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID No. 4, 10, 14, 15, 16, 26, 31, 33, 49, 57, 65, 67, 68, 73, 74, 79, 80, 94, 96, 99, 102, 103, 106, 118, 122, 124, 126, 128, 129, 131, 133, 134, 135, 140, 141, 144, 145, 146, 147, и 148 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения ОМЛ.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID No. 3, 9, 15, 56, 57, 67, 89, 122, 126, 135, 137, и 140 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения РПрЖ.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID No. 10, 11, 12, 14, 15, 17, 20, 23, 26, 30, 31, 33, 39, 45, 56, 57, 58, 59, 60, 67, 73, 74, 84, 85, 89, 91, 97, 98, 106, 115, 116, 121, 122, 126, 129, 131, 132, 134, 137, 140, 141, и 144 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения ГКК.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID No. 10, 17, 23, 51, 55, 56, 58, 59, 65, 74, 79, 87, 93, 95, 116, 118, 122, 126, 133, 137, 138, 140, 143, 146, и 148 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения РЯ.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID No. 12, 17, 23, 34, 59, 77, 92, 95, 97, 116, 133, 134, 137, 139, и 140 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения ПКК.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID No. 7, 10, 15, 17, 51, 53, 57, 59, 61, 63, 68, 77, 78, 85, 93, 121, 126, 129, 132, 133, 137, 138, 140, 142, 143, и 148 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения МРЛ.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID No. 1, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 15, 17, 28, 29, 34, 41, 53, 59, 64, 68, 70, 79, 83, 84, 85, 90, 92, 95, 98, 101, 111, 113, 117, 119, 121, 122, 126, 128, 129, 131, 132, 133, 135, 137, 138, 139, 142, 143, 144, и 148 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения ПлККГШ.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID No. 12, 23, 32, 73, 78, 104, 120, 122, 126, 134, 140, 141, и 142 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения РЖ.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID No. 12, 16, 25, 26, 32, 59, 65, 73, 74, 79, 80, 93, 99, 125, 126, 131, 133, 134, 135, 137, 138, 140, 143, 144, 145, 147, 148, и 149 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения ХЛЛ.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению пептидов в соответствии с настоящим изобретением для – предпочтительно комбинированного – лечения пролиферативных заболеваний, выбранных из группы: рак мочевого пузыря, острый миелогенный лейкоз (ОМЛ), рак молочной железы, рак желчных протоков, рак головного мозга, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), колоректальная карцинома, рак пищевода, рак желчного пузыря, рак желудка, гепатоклеточный рак (ГКК), карцинома клеток Меркеля, меланома, неходжкинская лимфома, немелкоклеточный рак легких (НМРЛ), рак яичника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечноклеточный рак, мелкоклеточный рак легких (МРЛ) и рак матки.

Настоящее изобретение, более того, относится к пептидам в соответствии с настоящим изобретением, имеющим способность связываться с молекулой главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) I класса или – в удлиненной форме (более длинные), 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: 149.

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 последовательность с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No.: 149, предпочтительно содержащий SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 48 или его вариантную аминокислотную последовательность.

Настоящее изобретение далее относится к активированным Т-клеткам, полученным способом в соответствии с настоящим изобретением, где указанная Т-

клетка селективно распознают клетку, которая экспрессирует полипептид, включающий аминокислотную последовательность в соответствии с настоящим изобретением.

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

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

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

Настоящее изобретение далее относится к применению в соответствии с настоящим изобретением, где указанные раковые клетки являются клетками рака мочевого пузыря, острого миелогенного лейкоза (ОМЛ), рака молочной железы, рака желчных протоков, рака головного мозга, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), колоректальной карциномы, рака пищевода, рака желчного пузыря, рака желудка, гепатоклеточного рака (ГКК), карциномы клеток Меркеля, меланомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечноклеточного

рака, мелкоклеточного рака легких (МРЛ) и рака матки и, предпочтительно, клетками рака мочевого пузыря.

Настоящее изобретение далее относится к биомаркерам на основе пептидов в соответствии с настоящим изобретением, в контексте изобретения называемые «мишенями», которые могут быть использованы при постановке диагноза рака, предпочтительно рака мочевого пузыря. В роли маркера может выступать избыточная презентация самого(их) пептида(ов) или избыточная экспрессия соответствующего(их) гена(ов). Эти маркеры могут также использоваться для предсказания вероятности успеха лечения, предпочтительно иммунотерапии, и, наиболее предпочтительно, иммунотерапии, направленной на ту же мишень, которая была идентифицирована биомаркером. Например, для окрашивания срезов опухоли для выявления присутствия интересующего пептида в комплексе с МНС может использоваться антитело или растворимый ТКР. Факультативно антитело обладает дополнительной эффекторной функцией, например, несет иммуностимулирующий домен или токсин.

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

Было продемонстрировано, что ARF1 избыточно экспрессируется в высокоинвазивных линиях клеток рака молочной железы и опухолях молочной железы наиболее агрессивных подвидов и на поздних стадиях и играет ключевую роль в инвазии клеток рака молочной железы за счет регуляции сигнального пути Rho/MLC. Таким образом, пониженный уровень экспрессии ARF1, как было показано на мышинных моделях ксенотрансплантатов, препятствует росту первичных опухолей молочной железы и ингибирует метастазы в легкие. Избыточная экспрессия ARF1 в линии клеток MCF7 (ER+) рака молочной железы, как было продемонстрировано, приводит к эпителиально-мезенхимальному переходу, при этом, как было показано, ARF1 контролирует межклеточную адгезию, онкогенную активацию Ras и экспрессию индукторов ЭМП (Schlienger et al., 2016;

Schlienger et al., 2014). Было продемонстрировано, что уровень ARF1 повышен при раке предстательной железы. Аберрантный онкогенный сигнальный путь MAPK при раке предстательной железы, как было продемонстрировано, находится по меньшей мере частично под контролем ARF1, позволяя предположить, что ARF1 является важнейшим регулятором прогрессирования рака предстательной железы, и, таким образом, может представлять собой ключевую молекулярную мишень при лечении и диагностике рака предстательной железы (Davis et al., 2016).

ARF3, как было продемонстрировано, является геном с нарушением регуляции экспрессии, который локализован внутри области разрыва линий клеток B42-11 и B42-16 эпителиального рака молочной железы, трансформированных в результате облучения (Unger et al., 2010). Уровень ARF3, как было показано, понижен при первичном раке желудка (Chang et al., 2009).

ARF4, как было показано, участвует в развитии аденокарциномы легких (Bidkhor et al., 2013). Сообщалось, что ARF4 является медиатором EGF-зависимого сигнального пути. Вместе с этим, регуляция ARF4, как было показано, задействована в миграции клеток молочной железы, указывая на то, что ARF4 может служить потенциальной терапевтической мишенью в лечении инвазивного и метастатического рака молочной железы (Jang et al., 2012).

Мутация(и) COL6A3 значимо предсказывала(и) лучшую общую выживаемость у пациентов с колоректальными карциномами вне зависимости от дифференциации опухоли и стадии по системе TNM (Yu et al., 2015). Уровень экспрессии COL6A3, как сообщалось, повышен при раке поджелудочной железы, раке толстой кишки, раке желудка, слизеобразующем плоскоклеточном раке и раке яичника. Варианты транскриптов, ассоциированные с раком, включая экзоны 3, 4 и 6, были обнаружены в клетках рака толстой кишки, рака мочевого пузыря, предстательной железы и рака поджелудочной железы (Arafat et al., 2011; Smith et al., 2009; Yang et al., 2007; Xie et al., 2014; Leivo et al., 2005; Sherman-Baust et al., 2003; Gardina et al., 2006; Thorsen et al., 2008). При раке яичника уровни COL6A3 коррелировали с более высокой

степенью злокачественности, а при раке поджелудочной железы, как было продемонстрировано, COL6A3 представлял собой подходящий диагностический биомаркер сыворотки (Sherman-Baust et al., 2003; Kang et al., 2014).

Мутацию гена IDH1 описывали как важный прогностический маркер при глиоме и было показано, что она распространена при глиомах II-III степени злокачественности и вторичных глиобластомах. Таким образом, мутантная форма IDH1 может играть важнейшую роль в пролиферации клеток и ангиогенезе при глиоме (Zhang et al., 2015b; Shi et al., 2016). IDH1 и несколько других мутаций описывали как рекуррентные молекулярно-генетические изменения, которые проявляются одновременно с ко-делецией 1p/19q и позволяют произвести идентификацию олигодендроглиом (Cahill et al., 2015). Как было продемонстрировано, недавно выявленная мутация гена IDH1, связанная с метаболизмом, ассоциируется с метастатическим раком поджелудочной железы и, как сообщалось, это редкая возможность для таргетной терапии в качестве варианта лечения протоковой аденокарциномы поджелудочной железы (Brody et al., 2016).

Исследования показали, что уровень LAMA5 был повышен при базальноклеточной карциноме, раке шейки матки и карциноме молочной железы (Simonova et al., 2015; Scotto et al., 2008; Mostafa et al., 2010; Georgiou et al., 2013).

Было показано, что уровень LRRC1 абберрантно повышен в препаратах гепатоклеточной карциномы по сравнению с прилегающими нераковыми тканями печени (Li et al., 2013).

NUP107 кодирует нуклеопорин 107, члена семейства нуклеопоринов. Он является незаменимым компонентом ядерного порового комплекса (RefSeq, 2002). Слияние генов MDM1-NUP107 было охарактеризовано как повторяющееся событие альтернативного сплайсинга при опухолевом тромбозе воротной вены, наиболее серьезного осложнения гепатоклеточной карциномы, по сравнению с

соответствующими образцами гепатоклеточной карциномы. Было продемонстрировано, что уровень NUP107 повышен в клеточной линии поджелудочной железы с высоким инвазивно-метастатическим потенциалом по сравнению с другой линией клеток поджелудочной железы с низким потенциалом (Zhang et al., 2015a; Tan et al., 2010).

OSR1 метилирован при раке желудка, что вызывает снижение его уровня и коррелирует с плохой выживаемостью. Избыточная экспрессия OSR1 ингибирует рост клеток, приводя к блокировке клеточного цикла и запускаемой гибели клеток посредством апоптоза в линиях клеток рака желудка. Кроме того, OSR1 вызывает транскрипцию p53, p21, Fas и рецептора смерти 5 и подавляет экспрессию TCF-1, циклина D1, циклин-зависимой киназы 4, цитоплазматического бета-катенина и LEF1 (Otani et al., 2014; Huang et al., 2004). OSR1 по-разному метилируется при аденокарциноме легких и может использоваться в качестве биомаркера (Rauch et al., 2012; Daugaard et al., 2016). OSR1 является маркером промежуточной мезодермы (Zhang et al., 2011; So and Danielian, 1999; Oeda et al., 2013). Мишенью мышьяка являются стволовые клетки и частично дифференцированные клетки-предшественники, вызывая онкогенную трансформацию, приводящую к избыточной экспрессии OSR1 (Tokar et al., 2013).

Уровень PKP1, как было показано, понижен при раке предстательной железы и аденокарциноме пищевода (Kaz et al., 2012; Yang et al., 2015). Нокаут PKP1 в неопухолевого линии клеток BPH-1 предстательной железы приводил к снижению апоптоза и дифференциальной экспрессии генов, таких как гена SPOCK1, ассоциированного с раком предстательной железы (Yang et al., 2015). В совокупности изменения экспрессии PKP1 и SPOCK1, по-видимому, является частым и важным явлением при раке предстательной железы, и предполагается, что PKP1 имеет функцию подавления опухоли (Yang et al., 2015). Снижение уровня экспрессии PKP1, как было показано, ассоциируется со значительно более коротким периодом до появления отдаленных метастазов при плоскоклеточной карциноме полости рта (Harris et al., 2015). Было описано, что потеря PKP1 за счет

метиляции промотора ассоциируется с прогрессированием синдрома Баррета в аденокарциному пищевода (Kaz et al., 2012). Было продемонстрировано, что уровень PKP1 повышен при немелкоклеточном раке легких и может быть хорошим маркером для различения образцов плоскоклеточной карциномы (Sanchez-Palencia et al., 2011). Уровень PKP1, как было показано, повышен в хорошо дифференцированной линии клеток GOT3 липосаркомы (Persson et al., 2008). Снижение уровня экспрессии PKP1, как описывалось, способствовало повышению подвижности клеток плоскоклеточной карциномы головы и шеи (Sobolik-Delmaire et al., 2007). Как было продемонстрировано, потеря PKP1 ассоциируется с онкогенезом шейки матки (Schmitt-Graeff et al., 2007). PKP1, как было показано, ассоциируется с локальными рецидивами или метастазами, а также плохой выживаемостью у пациентов с плоскоклеточной карциномой ротоглотки (Papagerakis et al., 2003).

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

Специфические элементы клеточных иммунных ответов способны к специфическому распознаванию и уничтожению опухолевых клеток. Выделение Т-клеток из популяций опухоль-инфильтрирующих клеток или из периферической крови предполагает, что такие клетки играют важную роль в естественной иммунной защите против рака. В частности, CD8-положительные Т-клетки, которые распознают пептиды, связанные с молекулами I класса главного комплекса гистосовместимости (МНС), играют важную роль в этом ответе. Эти пептиды обычно состоят из 8-10 аминокислотных остатков, полученных из белков или дефектных рибосомных продуктов (DRIP), находящихся в цитозоле. Молекулы

МНС человека называются также человеческими лейкоцитарными антигенами (HLA).

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

Понятие «пептид» в контексте настоящего описания обозначает серии аминокислотных остатков, связанных друг с другом обычно пептидными связями между альфа-аминными и карбонильными группами смежных аминокислот. Пептиды предпочтительно имеют длину в 9 аминокислот, но могут быть короче – 8 аминокислот в длину, и длиннее – 10, 11, 12, 13, 14 или 15 или длиннее и в случае пептидов, связанных с молекулами МНС II класса (удлиненные варианты пептидов по изобретению), они могут иметь длину в 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 или более аминокислот.

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

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

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

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

Для Т-клеточного «эпитопа» I класса необходим короткий пептид, который связан с рецептором МНС I класса, образующим трехчленный комплекс (альфа-цепь МНС I класса, бета-2-микроглобулин и пептид), который может быть распознан Т-клеткой, несущей подходящий Т-клеточный рецептор, связывающийся с комплексом

МНС/пептид с подходящей аффинностью. Пептиды, связывающиеся с молекулами МНС I класса, типично имеют длину в 8-14 аминокислот и, особенно типично, длину в 9 аминокислот.

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

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

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

Аллель	Популяция	Рассчитанный фенотип по частоте аллеля
DR2	Афроамериканцы (Северная Америка)	29,80%
DR3	Афроамериканцы (Северная Америка)	24,80%
DR4	Афроамериканцы (Северная Америка)	11,10%
DR5	Афроамериканцы (Северная Америка)	31,10%
DR6	Афроамериканцы (Северная Америка)	33,70%
DR7	Афроамериканцы (Северная Америка)	19,20%
DR8	Афроамериканцы (Северная Америка)	12,10%
DR9	Афроамериканцы (Северная Америка)	5,80%
DR1	Монголоиды (Северная Америка)	6,80%
DR2	Монголоиды (Северная Америка)	33,80%
DR3	Монголоиды (Северная Америка)	9,20%
DR4	Монголоиды (Северная Америка)	28,60%
DR5	Монголоиды (Северная Америка)	30,00%
DR6	Монголоиды (Северная Америка)	25,10%
DR7	Монголоиды (Северная Америка)	13,40%
DR8	Монголоиды (Северная Америка)	12,70%
DR9	Монголоиды (Северная Америка)	18,60%
DR1	Латиноамериканцы (Северная Америка)	15,30%
DR2	Латиноамериканцы (Северная Америка)	21,20%
DR3	Латиноамериканцы (Северная Америка)	15,20%
DR4	Латиноамериканцы (Северная Америка)	36,80%
DR5	Латиноамериканцы (Северная Америка)	20,00%
DR6	Латиноамериканцы (Северная Америка)	31,10%
DR7	Латиноамериканцы (Северная Америка)	20,20%
DR8	Латиноамериканцы (Северная Америка)	18,60%
DR9	Латиноамериканцы (Северная Америка)	2,10%
A*24	Филиппины	65%
A*24	Русские ненцы	61%
A*24:02	Япония	59%
A*24	Малайзия	58%
A*24:02	Филиппины	54%
A*24	Индия	47%
A*24	Южная Корея	40%
A*24	Шри-Ланка	37%
A*24	Китай	32%
A*24:02	Индия	29%
A*24	Западная Австралия	22%

Аллель	Популяция	Рассчитанный фенотип по частоте аллеля
A*24	США	22%
A*24	Россия, Самара	20%
A*24	Южная Америка	20%
A*24	Европа	18%

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

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

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

Нуклеотидная последовательность, кодирующая конкретный пептид, олигопептид или полипептид, может быть встречающейся в природе или может быть

синтезирована. В целом, сегменты ДНК, кодирующие пептиды, полипептиды и белки данного изобретения, собраны из фрагментов кДНК и коротких олигонуклеотидных линкеров или же из серий олигонуклеотидов для получения синтетического гена, который способен экспрессироваться в рекомбинантной транскрипционной единице, включающей регуляторные элементы, образованные из микробного или вирусного оперона.

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

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

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

Кодирующая область может быть получена из 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 фрагменты предлагаются в форме открытой рамки считывания, не прерываемой внутренними не-транслированными последовательностями или интронами, которые обычно присутствуют в эукариотических генах. Последовательности нетранслированной ДНК могут присутствовать за открытой рамкой считывания, где она не интерферирует с манипуляцией или экспрессией кодирующих областей.

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

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

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

Полинуклеотиды и рекомбинантные или иммуногенные полипептиды, раскрытые 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:

процентная доля идентичности = $100 [1 - (C/R)]$

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

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

(ii) каждая брешь в Контрольной последовательности и

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

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

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

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

подсчитанная здесь выше процентная доля идентичности меньше, чем установленная процентная доля идентичности.

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: 149 или ее вариант, который на 88% гомологичен последовательностям с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 149, или их варианту, который индуцирует перекрестную реакцию Т-клеток с указанным пептидом. Пептиды по изобретению обладают способностью связываться с молекулой главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) I класса или – удлинённые версии упомянутых пептидов – с МНС II класса.

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

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

Под «вариантом» данной аминокислотной последовательности авторы изобретения имеют в виду, что боковые цепи, например, одного или двух

аминокислотных остатков, изменены (например, путем их замещения боковой цепью остатка другой встречающейся в природе аминокислоты или какой-либо другой боковой цепью) так, что пептид по-прежнему способен связываться с молекулой HLA по существу таким же путем, как и пептид, состоящий из данной аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 149. Например, пептид может быть модифицирован таким образом, что он по меньшей мере сохранит, если не улучшит, способность взаимодействовать и связываться со связывающей бороздкой подходящей молекулы MHC, такой как HLA-A*02 или -DR, и, таким образом, он по меньшей мере сохранит, если не улучшит, способность связываться с ТКР активированных Т-клеток.

Данные Т-клетки могут затем вступать в перекрестную реакцию с клетками и уничтожать клетки, которые экспрессируют полипептид, который содержит природную аминокислотную последовательность родственного пептида, как определено в аспектах этого изобретения. По информации из научной литературы и банков данных (Rammensee et al., 1999; Godkin et al., 1997), конкретные позиции связывающихся с HLA пептидов являются типичными якорными остатками, формирующими центральную последовательность, подходящую к соединительному элементу рецептора HLA, который определяется полярными, электрофизическими, гидрофобными и пространственными свойствами полипептидных цепей, образующих связывающую бороздку. Так, специалист данной области будет в состоянии модифицировать аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 149, сохраняя известные якорные остатки, и будет в состоянии определить, сохраняют ли такие варианты способность связываться с молекулами MHC I или II класса. Варианты по настоящему изобретению сохраняют способность связываться с ТКР активированных Т-клеток, которые могут впоследствии вступать в перекрестную реакцию и уничтожать клетки, экспрессирующие полипептид, который содержит природную аминокислотную последовательность родственного пептида, как определено в аспектах настоящего изобретения.

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

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

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

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

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

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

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

или подвергнута негативному влиянию по сравнению с немодифицированным пептидом.

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

Таблица 6: Варианты и мотив пептида в соответствии с SEQ ID NO: 1, 3 и 15

Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
SEQ ID No 1	I	L	L	Q	A	S	V	Q	V			
Варианты									I			
									L			
									A			
		M										
		M							I			
		M							L			
		M							A			
		A										
		A							I			
		A							L			
		A							A			
		V										
		V							I			
		V							L			
		V							A			
		T										
		T							I			
		T							L			
		T							A			
		Q										
		Q							I			

[illegible]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения пептид состоит или по существу состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 149.

«Состоит по существу из» подразумевает, что пептид в соответствии с настоящим изобретением, помимо любой из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 149, 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 «Ii») HLA-DR, как взятый из банка данных NCBI, инвентарный номер - GenBank Accession-number X00497. В

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

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

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

Непептидной связью является, например, -CH₂-NH-, -CH₂S-, -CH₂CH₂-, -CH=CH-, -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- и -CH₂SO-. В патенте США № 4 897 445 предлагается метод твердофазного синтеза непептидных связей (-CH₂-NH) в полипептидных цепях, который включает полипептиды, синтезированные с использованием стандартной методики, и непептидную связь, синтезированную при реакции 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-флуоренилметоксикарбонильная группа может быть размещена на аминных концах пептидов. Кроме того, гидрофобная группа, трет-бутилоксикарбонильная или амидная группа может быть добавлена к карбоксильным концам пептидов.

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

Подобным образом, пептид или вариант по изобретению может быть модифицирован химическим способом посредством реакции отдельных аминокислот как до, так и после синтеза пептида. Примеры таких модификаций хорошо известны из уровня техники и обобщаются, например, в работе R. Lundblad, *Chemical Reagents for Protein Modification*, 3rd ed. CRC Press, 2004 (Lundblad, 2004), которая включена в описание по ссылке. Химическая модификация аминокислот включает, но без ограничения, модификацию с помощью ацилирования, амидинирования, пиридоксилирования лизина, 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: 149 и был получен синтетическим способом (например, синтезирован) в виде фармацевтически приемлемой соли. Способы синтетического получения пептидов хорошо известны в данной области. Соли пептидов в соответствии с настоящим изобретением существенно отличаются от пептидов по своему состоянию(ям) *in vivo*, так как синтезированные пептиды не являются солями *in vivo*.

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

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

осуществляется при использовании 20% пиперидина в N, N-диметилформамиде. Функциональные группы боковой цепи могут быть защищены получением таких соединений, как их бутиловые эфиры (в случае серина, треонина и тирозина), бутиловые сложные эфиры (в случае глютаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты), бутилоксикарбонильное производное (в случае лизина и гистидина), тритильное производное (в случае цистеина) и производное 4-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфонила (в случае аргинина). Если глютамин или аспарагин являются С-терминальными остатками, для защиты амидогруппы боковой цепи используется 4,4'-диметоксибензгидрильная группа. Твердофазный носитель основан на полимере полидиметилакриламиде, состоящем из трех мономеров: диметилакриламида (каркасный мономер), бис-акрилоилэтилендиамин (компонент для перекрестной сшивки, линкер) и метилового эфира акрилоилсаркозина (функционализирующий агент). Для образования легкорасщепляемой связи пептида и смолы используется нестойкое к действию кислот производное 4-гидроксиметилфеноксиуксусной кислоты. Все аминокислотные производные добавляются в виде предварительно синтезированных симметричных ангидридных производных за исключением аспарагина и глютамина, которые добавляются с применением обратной реакции соединения, опосредованной N, N-дициклогексилкарбодиимид/1-гидроксibenзотриазолом. Все реакции сочетания и снятия защитных групп отслеживались с помощью методов контроля с применением нингидрина, тринитробензолсульфоновой кислоты или изотина. После завершения синтеза пептиды отщепляются от смолы-носителя с сопутствующим удалением защитных групп боковой цепи при обработке 95% трифторуксусной кислотой, содержащей 50 % смеси поглотителей. Обычно используемые поглотители включают этандитиол, фенол, анизол и воду, окончательный выбор зависит от составляющих аминокислот синтезируемого пептида. Также возможна комбинация твердофазных и жидкофазных методов синтеза пептидов (см., например, (Bruckdorfer et al., 2004), и прилагаемые ссылки).

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

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

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

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

Для идентификации и относительной количественной оценки лигандов HLA с помощью масс-спектрометрического анализа молекулы HLA из подвергнутых шоковой заморозке образцов тканей были очищены и из них выделены HLA-ассоциированные пептиды. Выделенные пептиды были разделены и последовательности были идентифицированы с помощью методов жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (LC-MS) с ионизацией электрораспылением (nanoESI) в режиме реального времени. Полученные пептидные последовательности подтверждали сравнением картины фрагментации природных опухолеассоциированных пептидов (TUMAP), записанной на образцах рака мочевого пузыря (N = 15 A*02-положительных образцов), с картинами фрагментации соответствующих синтетических контрольных пептидов с идентичными последовательностями. Поскольку пептиды были идентифицированы непосредственно в качестве лигандов молекул HLA первичных опухолей, то эти результаты дают прямое доказательство естественного процессирования и презентации идентифицированных пептидов на ткани первичной раковой опухоли, полученной от 15 пациентов, больных раком мочевого пузыря.

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

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

Кроме избыточной презентации пептида была исследована экспрессия мРНК исходного гена. Данные по мРНК, полученные с помощью секвенирования РНК (RNASeq) из нормальных тканей и раковых тканей (ср. Пример 2, Фигуру 2).

Дополнительным источником данных о нормальных тканях служил общедоступный банк данных по экспрессии РНК из приблизительно 3000 образцов нормальных тканей (Lonsdale, 2013). Пептиды, которые получены из белков, которые кодируются мРНК, демонстрирующей высокую степень экспрессии в раковой ткани, но ее очень низкий уровень или отсутствие в жизненно важных нормальных тканях, были включены как предпочтительные в настоящее изобретение.

В настоящем изобретении предложены пептиды, которые пригодны для лечения раковых заболеваний / опухолей, предпочтительно рака мочевого пузыря, клетки которых презентируют в избытке или исключительно пептиды по изобретению. Как показал масс-спектрометрический анализ, эти пептиды естественно презентировались молекулами HLA на образцах первичного рака мочевого пузыря человека.

Многие из исходных генов/белков (называемых также «белками полной длины» или «базовыми белками»), из которых были получены пептиды, были в высокой степени избыточно экспрессированы в клетках рака по сравнению с нормальными тканями – понятие «нормальные ткани» в связи с настоящим изобретением подразумевает здоровые клетки мочевого пузыря или клетки другой нормальной ткани, демонстрирующие высокую степень ассоциации исходных генов с опухолью (см. Пример 2). Более того, сами пептиды в высшей степени избыточно презентируются на опухолевой ткани – понятие «опухолевая ткань» в связи с настоящим изобретением подразумевает образец ткани пациента, страдающего раком мочевого пузыря, но не на нормальных тканях (см. Пример 1).

Связанные с HLA пептиды могут распознаваться иммунной системой, конкретно Т-лимфоцитами. Т-клетки могут разрушать клетки, презентирующие распознанный комплекс HLA/пептид; к примеру, клетки рака мочевого пузыря, 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. 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 презентируются молекулой МНС. Настоящее описание также относится к нуклеиновым кислотам, векторам и клеткам-хозяевам для экспрессии ТКР и пептидам по настоящему изобретению; и методам их применения.

Настоящее описание также относится к фрагментам ТКР в соответствии с изобретением, которые способны связываться с пептидным антигеном в

соответствии с настоящим изобретением, когда они презентирются 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.

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, презентруемым молекулой HLA. Это понятие включает также так называемые гамма/дельта-ТКР.

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

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

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

домены альфа и бета могут также включать С-терминальные трансмембранные (TM) домены, которые заякоривают альфа- и бета-цепи на клеточной мембране.

В отношении гамма-/дельта-ТКР, понятие «гамма вариабельный 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 вариабельный 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 согласно настоящему описанию предпочтительно связываются с комплексом пептида–молекула 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 формируют дисульфидную связь между последовательностью константного домена TRAC и последовательностью константного домена TRBC1 или TRBC2 ТКР.

С введением межцепочечной связи, упомянутой выше, или без нее альфа/бета гетеродимерные ТКР по настоящему изобретению могут иметь последовательность константного домена TRAC и последовательность константного домена TRBC1 или TRBC2, и последовательность константного домена TRAC и последовательность константного домена TRBC1 или TRBC2 ТКР 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-A2-рестриктированных патогенов, обладают показателями KD, которые, в основном, примерно в 10 раз ниже по сравнению с ТКР, специфическими для HLA-A2-рестриктированных опухолеассоциированных аутоантигенов. Сейчас известно, хотя опухолевые антигены имеют иммуногенный потенциал, поскольку опухоли возникают из собственных клеток индивида, только мутантные белки или белки с изменениями в трансляционном процессинге будут восприниматься иммунной системой как чужеродные. Антигены, уровень которых повышен или которые экспрессируются в избытке (так называемые аутоантигены), не будут в обязательном порядке вызывать функциональный иммунный ответ против опухоли: Т-клетки, экспрессирующие ТКР, которые являются высоко активными по отношению к данным антигенам, будут подвергаться отрицательному отбору внутри вилочковой железы в процессе, известном как центральная толерантность, что означает, что останутся лишь Т-клетки с низкоаффинными ТКР к аутоантигенам. Поэтому аффинность ТКР или вариантов согласно настоящему описанию по отношению к пептидам может быть усилена способами, хорошо известными из уровня техники.

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

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

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

В другом аспекте для получения Т-клеток, экспрессирующих ТКР согласно настоящему описанию, РНК ТКР синтезируют с помощью методик, известных из уровня техники, например, транскрипционные системы *in vitro*. Синтезированные *in 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, фосфолипид-киназой (PGK), β -актином, убиквитином и комбинированным

промотором вируса обезьян 40 (SV40)/CD43, фактором элонгации (EF)-1а 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 (сPPT), который способствует ядерной транслокации лентивирусных конструкций (Follenzi et al., 2000), и пост-транскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (wPRE), который повышает уровень экспрессии трансгена за счет увеличения стабильности РНК (Zufferey et al., 1999) (Zufferey et al., 1999).

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

Для достижение высоких уровней экспрессии ТКР на поверхности требуется транскрипция высоких уровней как цепей ТКР-альфа, так и ТКР-бета, введенного ТКР. Для этого цепи ТКР-альфа и ТКР-бета согласно настоящему описанию могут быть клонированы в бицистронные конструкции в одном векторе, который, как было показано, способен преодолеть данное препятствие. Использование участка внутренней посадки рибосомы вируса (IRES) между цепями ТКР-альфа и ТКР-бета приводит к скоординированной экспрессии обеих цепей, поскольку цепи ТКР-альфа и ТКР-бета образуются из одного транскрипта, который разделяется на два белка во время транскрипции, обеспечивая получение равного молярного соотношения цепей ТКР-альфа и ТКР-бета (Schmitt et al., 2009).

Нуклеиновые кислоты, кодирующие ТКР согласно настоящему описанию, могут быть кодон-оптимизированы для увеличения экспрессии клеткой-хозяином. Избыточность генетического кода позволяет кодирование некоторых аминокислот

более чем одним кодоном, однако некоторые конкретные кодоны менее «оптимальны», чем другие, по причине относительной доступности подходящих тРНК, а также других факторов (Gustafsson et al., 2004). Как было показано, модификации последовательностей генов ТКР-альфа и ТКР-бета, так чтобы каждая аминокислота кодировалась оптимальным кодоном для экспрессии генов млекопитающих, а также удаление нестабильных мотивов мРНК или криптических сайтов сплайсинга, существенно усиливали экспрессию генов ТКР-альфа и ТКР-бета (Scholten et al., 2006).

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

Для снижения ошибочного спаривания С-концевой домен введенных цепей ТКР согласно настоящему описанию может быть модифицирован в целях стимуляции межцепочечной аффинности, при этом снижая способность введенных цепей спариваться с эндогенным ТКР. Данные стратегии могут включать замещение С-концевых доменов ТКР-альфа и ТКР-бета-цепей человека их мышинными эквивалентами (С-концевой «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 рамках лечения. Предпочтительно, если фармацевтическая композиция является стерильной и произведена в соответствии с правилами GMP (надлежащей производственной практики).

Фармацевтические композиции включают пептиды как в свободной форме, так и в форме фармацевтически приемлемой соли (см. также выше). Используемое в контексте данного изобретения понятие «фармацевтически приемлемая соль» относится к производным раскрытых пептидов, причем пептид модифицирован путем получения кислых или основных солей вещества. Например, кислые соли получают из свободного основания (как правило, где нейтральная форма лекарственного средства имеет нейтральную группу $-NH_2$) с применением реакции с подходящей кислотой. Подходящие кислоты для получения кислых солей включают как органические кислоты, например, уксусную кислоту, пропионовую кислоту, гликолевую кислоту, пировиноградную кислоту, щавелевую кислоту, яблочную кислоту, малоновую кислоту, янтарную кислоту, малеиновую кислоту, фумаровую кислоту, винную кислоту, лимонную кислоту, бензойную кислоту, коричную кислоту, миндальную кислоту, метансульфоновую кислоту, этансульфоновую кислоту, 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 MHC I класса, которые стимулируют CD8

Т-клетки, партнеры в слиянии или участки гибридной молекулы надлежащим образом предоставляют эпитопы, которые стимулируют CD4-положительные Т-клетки. CD4- и CD8-стимулирующие эпитопы хорошо известны из уровня техники и включают те, что были идентифицированы в настоящем изобретении.

В одном аспекте вакцина включает по меньшей мере один пептид, имеющий аминокислотную последовательность с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No 149, и по меньшей мере один дополнительный пептид, предпочтительно от двух до 50, более предпочтительно от двух до 25, еще более предпочтительно от двух до 20 и, наиболее предпочтительно, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать или восемнадцать пептидов. Пептид(ы) может(могут) быть получен(ы) из одного или более специфических ТАА и может(могут) связываться с молекулами МНС I класса.

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

Был разработан ряд способов связывания полинуклеотидов, в особенности ДНК, с векторами, например, с помощью комплементарных липких концов. К примеру, к сегменту ДНК могут быть добавлены комплементарные гомополимерные хвосты для встраивания в векторную ДНК. Этот вектор и сегмент ДНК в таком случае

соединены водородной связью между комплементарными гомополимерными хвостами, образуя молекулы рекомбинантной ДНК.

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

В желаемом способе модификации ДНК, кодирующей полипептид по изобретению, используется полимеразная цепная реакция, как раскрыто в работе Saiki RK 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 плазмида, 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 Жолла, Калифорния 92037, США. Плазмиды pRS403, pRS404, pRS405 и pRS406 являются дрожжевыми интегрирующими плазмидами (Ylps) и включают дрожжевые селектируемые маркеры HIS3, TRP1, LEU2 и URA3. Плазмиды pRS413-416 являются дрожжевыми плазмидами с центромерами (Ycp). Основанные на промоторе CMV векторы (например, компании Sigma-Aldrich) обеспечивают кратковременную или устойчивую экспрессию, цитоплазмическую экспрессию или секрецию и N-терминальную или C-терминальную маркировку в различных комбинациях FLAG, 3xFLAG, 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 дрожжи, клетки насекомых и млекопитающих, предпочтительно клетки позвоночных, таких как линии фибробластных клеток и клеток толстой кишки таких видов как мышь, крыса, обезьяна или человек. Дрожжевые клетки-хозяева включают YPH499, YPH500 и YPH501, которые, как правило, имеются в наличии в Stratagene Cloning Systems, Ла Джола, Калифорния 92037, США. Предпочтительные клетки-хозяева

млекопитающих включают клетки яичника китайского хомяка (CHO), имеющиеся в наличии в ATCC как CCL61, эмбриональные клетки швейцарской мыши линии NIH/3T3, имеющиеся в наличии в ATCC как CRL 1658, клетки COS-1 из почек обезьяны, имеющиеся в наличии в ATCC как CRL 1650, и клетки 293, являющиеся эмбриональными клетками почек эмбрионов человека. Предпочтительными клетками насекомых являются клетки Sf9, которые могут трансфицироваться с помощью бакуловирусных векторов экспрессии. Обзор в отношении выбора подходящих клеток-хозяев для экспрессии представлен, например, в учебном пособии авторов Paulina Balbás и Argelia Lorence «Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols », часть первая, второе издание, ISBN 978-1-58829-262-9, и другой литературе, известной специалисту данной области.

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

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

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

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

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

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

включают в/к, в/м, п/к, в/б и в/в. Вводиться могут, к примеру, дозы от 50 мкг до 1,5 мг, предпочтительно от 125 мкг до 500 мкг пептида или ДНК, в зависимости от соответствующего пептида или ДНК. Дозировка в данном диапазоне успешно использовалась в предыдущих клинических исследованиях (Walter et al., 2012).

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

Медикамент по изобретению может также включать один или более адъювантов. Адъюванты – это вещества, которые неспецифически усиливают или потенцируют иммунный ответ (например, иммунные ответы, опосредованные CD8-положительными Т-клетками или хелперными Т-клетками (TH) на антиген, и могут, таким образом, рассматриваться как полезные в медикаменте по настоящему изобретению. Подходящие адъюванты включают, но без ограничения, 1018 ISS, соли алюминия, AMPLIVAX®, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM,

флагеллин или лиганды TLR5, полученные из флагеллина, лиганд FLT3, ГМ-КСФ, IC30, IC31, имиквимод (ALDARA®), резимиквимод, ImuFact IMP321, интерлейкины, такие как ИЛ-2, ИЛ-13, ИЛ-21, интерферон-альфа или бета или их пегилированные производные, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, иммуностимулирующие комплексы ISCOM, JuvImmune®, LipoVac, MALP2, MF59, монофосфорил липид А, Монтанид IMS 1312, Монтанид ISA 206, Монтанид ISA 50V, Монтанид ISA-51, эмульсии «вода в масле» и «масло в воде», OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, векторную систему RepTel®, основанные на поли-(лактид когликолиде) [PLG] и декстрани 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-), 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).

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 В1 описывается комбинированное применение CpG-олигонуклеотидов, адъювантов, не включающих нуклеиновые кислоты, и антигена для вызывания антиген-специфического иммунного ответа. Антагонистом CpG TLR9 является dSLIM (иммуномодулятор со структурой типа двуцепочечный стебель-петля) компании Mologen (Берлин, Германия), который является предпочтительным компонентом фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Также могут быть использованы другие молекулы, связывающиеся с TLR, такие как TLR 7, TLR 8 и/или TLR 9, связывающиеся с РНК.

Другие примеры пригодных к использованию адъювантов включают, но без ограничения, химически модифицированные CpG (например, CpR, Idera), аналоги dsРНК, такие как поли-(I:C) и их производные (например, AmpliGen®, Hiltonol®, поли-(ICLC), поли(IC-R), поли(I:C12U), бактериальные ДНК или РНК, отличные от CpG, а также иммуноактивные малые молекулы и антитела, такие как циклофосфамид, сунитиниб, бевацизумаб®, целебрекс, NCX-4016, силденафил,

тадалафил, варденафил, сорафениб, темозоломид, темсиролимус, XL-999, CP-547632, пазопаниб, VEGF Trap, ZD2171, AZD2171, анти-CTLA4, другие антитела, нацеленные на основные структуры иммунной системы (например, антитела к CD40, TGFβ, рецептору TNFα) и SC58175, которые могут действовать терапевтически и/или как адъюванты. Количества и концентрации адъювантов и добавок, пригодных для использования в контексте настоящего изобретения, могут быть легко определены опытным специалистом без проведения излишних экспериментов.

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

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

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

Эта композиция используется для парентерального введения, такого как подкожное, 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 дальнейшей информации о полипептидных каркасах см., например, раздел уровня техники патентной заявки WO 2014/071978A1 и цитируемую в ней литературу.

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

Аптамеры, распознающие молекулы, которые находятся на поверхности клеток, были идентифицированы в последнее десятилетие и предоставляют возможность

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

Могут быть отобраны ДНК-аптамеры, проявляющие широкий спектр свойств по распознаванию различных раковых клеток, и, в частности, клеток, образованных из солидных опухолей, тогда как неопухолежденные 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 149, в соответствии с представленным изобретением с молекулой

MHC, 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 MHC/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 (MHC) I или II класса в комплексе с рестриктированным по HLA антигеном, причем способ включает: иммунизацию генетически модифицированного, не являющегося человеком млекопитающего, содержащего клетки, экспрессирующие молекулы указанного главного комплекса гистосовместимости человека (MHC) I или II класса с растворимой формой молекулы MHC 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 (MHC) I или II класса в комплексе с указанным рестриктированным по HLA антигеном.

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

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

Предпочтительно, если антитело связывается с аффинностью связывания ниже 20 наномолей, предпочтительно ниже 10 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 149 или их вариант, который по меньшей мере на 88% гомологичен (предпочтительно, если он идентичен) последовательности с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 149, или их варианту, который индуцирует перекрестную реакцию Т-клеток с указанным пептидом, где указанный пептид не является базовым полипептидом полной длины.

Настоящее изобретение далее относится к пептиду, включающему последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 149 или их вариант, который по меньшей мере на 88% гомологичен (предпочтительно, если он идентичен) SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 149, 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: 149.

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

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

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

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

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

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

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: 149 или указанную вариантную аминокислотную последовательность.

Настоящее изобретение далее относится к активированным Т-клеткам, полученным способом в соответствии с настоящим изобретением, где указанные

Т-клетки селективно распознают клетку, которая аберрантно экспрессирует полипептид, включающий аминокислотную последовательность в соответствии с настоящим изобретением.

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

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

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

Настоящее изобретение далее относится к применению в соответствии с изобретением, где указанные раковые клетки являются клетками рака мочевого пузыря или других солидных или гематологических опухолей, таких как острого миелогенного лейкоза (ОМЛ), рака желчных протоков, рака головного мозга, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), колоректальной карциномы, рака пищевода, рака желчного пузыря, рака желудка, гепатоклеточного рака (ГКК), карциномы клеток Меркеля, меланомы, неходжкинской лимфомы,

немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, почечноклеточного рака, мелкоклеточного рака легких (МРЛ) и рака матки.

Настоящее изобретение далее относится к конкретным белкам-маркерам и биомаркерам, основанным на пептидах в соответствии с настоящим изобретением, в контексте изобретения называемые «мишенями», которые могут быть использованы при постановке диагноза и/или составлении прогноза течения рака мочевого пузыря. Настоящее изобретение относится также к применению этих новых мишеней для лечения рака.

Понятие «антитело» или «антитела» используется в контексте данного изобретения в широком смысле и включает как поликлональные, так и моноклональные антитела. В дополнение к интактным или «полным» молекулам иммуноглобулина в понятие «антитела» включены также фрагменты (например, участки CDR, фрагменты Fv, Fab и Fc) или полимеры таких молекул иммуноглобулина и гуманизированные версии молекул иммуноглобулина, при условии, что они проявляют любое из желаемых свойств (например, специфически связываются с (поли)пептидным маркером рака мочевого пузыря, доставляют токсин к клетке рака мочевого пузыря, экспрессирующей раковый ген-маркер на повышенном уровне и/или ингибируют активность полипептида-маркера рака мочевого пузыря) в соответствии с изобретением.

Если возможно, антитела по изобретению могут быть куплены в коммерческих источниках. Антитела по изобретению могут быть также получены при использовании хорошо известных способов. Опытному специалисту будет понятно, что для получения антител по изобретению могут использоваться как полипептидные маркеры рака мочевого пузыря 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: 149, полипептид или вариант или его фрагмент может быть экспрессирована в прокариотических клетках (например, бактерий) или эукариотических клетках (например, дрожжей, насекомых или клетках млекопитающих), после чего рекомбинантный белок может быть очищен и использован в получении препарата из моноклональных или поликлональных антител, которые специфически связываются с полипептидным маркером рака мочевого пузыря, использованным для получения антитела по изобретению.

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

Понятие «моноклональное антитело» в контексте настоящего изобретения обозначает антитело, полученное из, по существу, гомогенной популяции антител, т. е. отдельные антитела внутри популяции идентичны за исключением возможных

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

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

которых некоторые остатки CDR и, возможно, остатки FR заменены на остатки аналогичных сайтов антител грызунов.

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

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

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

эффективным образом. Антитела также могут вводиться внутритуморальными или перитуморальными способами, чтобы вызвать местные, а также и системные терапевтические эффекты. Предпочтительными являются местное или внутривенное введение.

Эффективная дозировка и режим введения антител могут быть определены эмпирически, а принятие таковых решений под силу специалисту данной области. Специалистам данной области будет понятно, что дозировка антител, которые должны быть введены, будет варьироваться в зависимости от, например, субъекта, которому будет вводиться антитело, способа введения, конкретного типа используемого антитела и других вводимых медикаментов. Типичная 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 рака мочевого пузыря, 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), (специфически) 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.

Антитела или ТКР могут также применяться для диагностики *in vivo*. Как правило, антитело помечают радионуклеотидом (таким как ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^3H , ^{32}P или ^{35}S), так что опухоль может быть локализована с помощью иммуносцинтиграфии. В одном варианте осуществления антитела или их фрагменты связываются с внеклеточными доменами двух или более мишеней белка, выбранного из группы, состоящей из указанных выше белков, при показателе аффинности (K_d) ниже чем 1×10^{-6} М.

Антитела для диагностических целей могут помечаться зондами, подходящими для обнаружения различными способами визуализации. Способы обнаружения зондов включают, но без ограничения, флуоресценцию, световую, конфокальную и электронную микроскопию; магнитно-резонансную томографию и спектроскопию;

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 дрозодилы. TAP - это транспортер, связанный с процессингом антигена.

Линия человеческих клеток с недостаточностью T2, на которые загружаются пептиды, имеется в наличии в Американской коллекции типовых культур, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, США под каталожным номером CRL 1992; клеточная линия дрозифилы, 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 SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 149 или вариант такой аминокислотной последовательности.

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

полипептидом или инфицированные рекомбинантным вирусом. S. Walter и соавт. (Walter et al., 2003) описывают прайминг Т-клеток *in vitro* с использованием искусственных антигенпрезентирующих клеток (иАПК), что является также подходящим способом получения Т-клеток против выбранного пептида. В настоящем изобретении иАПК были получены прикреплением предварительно образованных комплексов МНС-пептид к поверхности полистироловых частиц (микросфер) с помощью биохимического способа с биотином-стрептавидином. Данная система допускает точный контроль плотности МНС на иАПК, который позволяет селективно вызвать высоко- или 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 дрозодилы и Т2-клеток, для презентации антигенов могут использоваться другие клетки, такие как клетки яичника китайского хомяка (CHO), бакуловирус-инфицированные клетки насекомых, бактерии, дрожжи и инфицированные осповакциной клетки-мишени. Кроме того, могут быть использованы растительные вирусы (см., например, работу Porta и соавт. (Porta et al., 1994) в которой описывается разработка мозаичного вируса китайской вигны как высокопродуктивной системы презентации чужеродных пептидов.

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

Активированные Т-клетки, полученные с помощью приведенного выше способа, будут селективно распознавать клетку, которая аберрантно экспрессирует полипептид, включающий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO 149.

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

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

Т-клетки по настоящему изобретению могут быть использованы в качестве активных ингредиентов в терапевтической композиции. Таким образом, в изобретении предложен также способ уничтожения клеток-мишеней у пациента, чьи клетки-мишени аберрантно экспрессируют полипептид, включающий

аминокислотную последовательность по изобретению, причем способ включает введение пациенту эффективного числа Т-клеток, как определено выше.

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

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

Протоколы для этого так называемого адоптивного переноса Т-клеток хорошо известны из уровня техники. С обзорами можно ознакомиться в работах Gattinoni 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 Т-клеточного рецептора, нуклеиновая кислота которого клонирована и введена в клетку-хозяин, предпочтительно Т-клетку. Данная сконструированная Т-клетка может быть затем введена пациенту для лечения рака.

Любая молекула по изобретению, т. е. пептид, нуклеиновая кислота, антитело, вектор экспрессии, клетка, активированная Т-клетка, Т-клеточный рецептор или нуклеиновая кислота, кодирующая его, пригодна для лечения нарушений, характеризующихся клетками, ускользающими от иммунного ответа. Поэтому любая молекула по настоящему изобретению может применяться в качестве

медиамента или в производстве медиамента. 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, бутылкой, флаконом, шприцем или пробиркой; и он может быть контейнером многоразового применения. Фармацевтическая композиция предпочтительно является лиофилизированной.

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

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

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

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

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

формы, которая может быть превращена в жидкость при добавлении подходящих растворителей, которые, предпочтительно, предоставляются в другом, отдельном, контейнере.

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

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

Так как пептиды по изобретению были выделены из клеток рака мочевого пузыря, медикамент по изобретению предпочтительно используется для лечения рака мочевого пузыря.

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 раком мочевого пузыря с различными HLA-A, HLA-B и HLA-C-аллелями. Оно может содержать пептиды, связанные с молекулами MHC I класса и MHC II класса или удлиненные пептиды, связанные с молекулами MHC I класса. Помимо опухолиассоциированных пептидов, собранных из нескольких тканей рака мочевого пузыря, хранилище может содержать маркерные пептиды, связанные с HLA-A*02 и HLA-A*24. Эти пептиды позволяют произвести количественное сравнение интенсивности Т-клеточного иммунного ответа, индуцированного пептидами TUMAP, и, следовательно, позволяют сделать важный вывод о способности вакцины вызывать противоопухолевые ответы. Во-вторых, они выполняют функцию важных пептидов положительного контроля, полученных «не из собственного» антигена в

случае, если у пациента не наблюдаются вызванные вакциной Т-клеточные ответы на пептиды TUMAP, полученные из «собственных» антигенов. И в-третьих, оно может позволить сделать заключения относительно статуса иммунокомпетентности пациента.

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

1. HLA-лиганды из злокачественного материала идентифицировали с помощью масс-спектрометрии.
2. Для идентификации экспрессированных в избытке генов в злокачественной ткани (рак мочевого пузыря) по сравнению с рядом нормальных органов и тканей применяли анализ экспрессии информационной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) всего генома.
3. Идентифицированные HLA-лиганды сравнивали с данными по экспрессии генов. Пептиды, презентуемые в избытке или селективно презентуемые на опухолевой ткани, предпочтительно кодируемые селективно экспрессированными или экспрессированными в избытке генами, выявленными на этапе 2, считали подходящими TUMAP-кандидатами для мультипептидной вакцины.
4. Было произведено изучение литературы для выявления дополнительных свидетельств, подтверждающих релевантность идентифицированных в качестве TUMAP пептидов.
5. Релевантность избыточной экспрессии на уровне мРНК подтверждали повторным обнаружением выбранных на этапе 3 пептидов TUMAP на опухолевой ткани и отсутствием (или нечастым обнаружением) на здоровых тканях.

6. В целях оценки того, может ли быть осуществима индукция *in vivo* Т-клеточных ответов выбранными пептидами, были проведены анализы иммуногенности *in vitro* при использовании человеческих Т-клеток здоровых доноров, а также пациентов, больных раком мочевого пузыря.

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), презентируемых 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, презентируемые опухолевым образцом, идентифицируют с помощью: (а1) сравнения данных по экспрессии в опухолевом образце с данными нормальной ткани, соответствующей типу ткани опухолевого образца, для идентификации белков, которые в опухолевом образце экспрессируются в избытке или аберрантно; и (а2) установления корреляции между данными экспрессии и последовательностями лигандов МНС, связанных с молекулами МНС I и/или II класса в опухолевом образце, в целях идентификации лигандов МНС, которые получены из белков, избыточно или аберрантно экспрессируемых опухолью. Предпочтительно, если последовательности лигандов МНС идентифицируются с помощью элюирования связанных пептидов из молекул МНС, выделенных из опухолевого образца, и секвенирования элюированных лигандов. Предпочтительно, если опухолевый образец и нормальная ткань получены от одного и того же пациента.

Помимо этого, или в качестве альтернативы этому, при выборе пептидов с использованием модели хранилища (банка данных) пептиды TUMAP могут быть идентифицированы у пациента *de novo* и затем быть включены в вакцину. В качестве одного примера: пептиды-кандидаты TUMAP могут быть идентифицированы у пациента с помощью (а1) сравнения данных по экспрессии в

опухолевом образце с данными нормальной ткани, соответствующей типу ткани опухолевого образца, для идентификации белков, которые в опухолевом образце экспрессируются в избытке или абберрантно; и (a2) установления корреляции между данными экспрессии и последовательностями лигандов МНС, связанных с молекулами МНС I и/или II класса в опухолевом образце, в целях идентификации лигандов МНС, которые получены из белков, избыточно или абберрантно экспрессируемых опухолью. В качестве другого примера: могут быть идентифицированы белки, имеющие мутации, являющиеся уникальными для опухолевого образца, соотносимого с соответствующей нормальной тканью отдельного пациента, и могут быть идентифицированы пептиды TUMAP, специфической мишенью которых является мутация. Например, геном опухоли и соответствующей нормальной ткани могут быть секвенированы методом полногеномного секвенирования: для обнаружения несинонимичных мутаций на кодирующих белок участках генов геномную ДНК и РНК экстрагируют из опухолевых тканей, а нормальную, не имеющую мутаций геномную ДНК зародышевой линии экстрагируют из мононуклеарных клеток периферической крови (МПК). Применяемый подход секвенирования нового поколения (NGS) заключается в повторном секвенировании кодирующих белок участков (повторное секвенирование экзона). В этих целях экзонную ДНК из человеческих образцов фиксируют с помощью поставляемых изготовителем наборов для обогащения целевыми фрагментами, за чем следует секвенирование, например, с помощью системы HiSeq2000 (Illumina). В дополнение к этому опухолевую мРНК секвенируют для прямого количественного определения генной экспрессии и подтверждения того, что мутировавшие гены экспрессированы в опухолях пациентов. Считывание полученных в результате миллионов последовательностей осуществляется алгоритмами программного обеспечения. Получаемый список содержит мутации и экспрессию генов. Опухолеспецифические соматические мутации определяют сравнением с вариантами зародышевой линии из МПК и устанавливают приоритетность. Идентифицированные *de novo* пептиды могут быть затем испытаны на иммуногенность, как описывается выше в случае хранилища, и

пептиды-кандидаты TUMAP, обладающие подходящей иммуногенностью, выбирают для включения в вакцину.

В отдельном варианте осуществления изобретения пептиды, включенные в вакцину, идентифицируют с помощью: (а) идентификации опухолеассоциированных пептидов (TUMAP), презентируемых 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), презентируемых 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 рака мочевого пузыря, и так как было определено, что данные пептиды не присутствуют или присутствуют в небольшом количестве в нормальных тканях, то эти пептиды могут быть использованы для диагностики наличия рака.

Присутствие заявленных пептидов на тканевых биоптатах и в образцах крови может помочь патоморфологу в постановке диагноза рака. Выявление конкретных пептидов с помощью антител, масс-спектрометрии или других методов, известных из уровня техники, могут дать патоморфологу свидетельства того, что образец ткани является злокачественной или воспаленной или пораженной заболеванием вообще, или же может использоваться в качестве биомаркера рака мочевого пузыря. Присутствие групп пептидов может позволить классифицировать или выделить подклассы пораженных тканей.

Обнаружение пептидов на образцах пораженной заболеванием ткани может позволить принять решение о пользе от терапии, воздействующей на иммунную систему, в особенности, если Т-лимфоциты, как известно или ожидается, задействованы в механизме действия. Отсутствие экспрессии МНС является хорошо описанным механизмом, при котором инфицированные или злокачественные клетки уклоняются от иммунного контроля. Таким образом,

присутствие пептидов показывает, что этот механизм не используется проанализированными клетками.

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

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

ФИГУРЫ

На Фигурах 1A–1R представлена избыточная презентация различных пептидов в нормальных тканях (белые столбцы) и тканях рака мочевого пузыря (черные столбцы). Фигура 1A: символ гена: GATA3, пептид: VLFNIDGQGNNHV (SEQ ID NO.: 110); ткани слева направо: 3 жировые ткани, 3 надпочечные железы, 16 клеток крови, 15 кровеносных сосудов, 9 костных мозгов, 10 головных мозгов, 7 молочных

желез, 6 пищеводов, 2 глаза, 3 желчных пузыря, 6 сердец, 12 почек, 19 толстых кишок, 19 печеней, 45 легких, 7 лимфатических узлов, 8 нервов, 3 яичника, 8 поджелудочных желез, 3 паращитовидные железы, 1 брюшина, 5 гипофизов, 6 плацент, 3 плевры, 3 предстательные железы, 7 слюнных желез, 5 скелетных мышц, 12 образцов кожи, 3 тонкие кишки, 11 селезенки, 5 желудков, 4 семенника, 2 вилочковые железы, 2 щитовидные железы, 9 трахей, 6 мочеточников, 5 маток, 8 мочевых пузырей, 15 образцов рака мочевого пузыря. Кроме того, пептид был выявлен на клетках 3/15 раков мочевого пузыря. Фигура 1B: символ гена: KRT7, пептид: GLLKAYSIRTA (SEQ ID NO.: 2); ткани слева направо: 3 жировые ткани, 3 надпочечные железы, 16 клеток крови, 15 кровеносных сосудов, 9 костных мозгов, 10 головных мозгов, 7 молочных желез, 6 пищеводов, 2 глаза, 3 желчных пузыря, 6 сердец, 12 почек, 19 толстых кишок, 19 печеней, 45 легких, 7 лимфатических узлов, 8 нервов, 3 яичника, 8 поджелудочных желез, 3 паращитовидные железы, 1 брюшина, 5 гипофизов, 6 плацент, 3 плевры, 3 предстательные железы, 7 слюнных желез, 5 скелетных мышц, 12 образцов кожи, 3 тонкие кишки, 11 селезенки, 5 желудков, 4 семенника, 2 вилочковые железы, 2 щитовидные железы, 9 трахей, 6 мочеточников, 5 маток, 8 мочевых пузырей, 15 образцов рака мочевого пузыря. Кроме того, пептид был выявлен на клетках 3/15 раков мочевого пузыря. Фигура 1C: символ гена: CXorf57, пептид: YLDPSLNSL (SEQ ID NO.: 112); ткани слева направо: 3 жировые ткани, 3 надпочечные железы, 16 клеток крови, 15 кровеносных сосудов, 9 костных мозгов, 10 головных мозгов, 7 молочных желез, 6 пищеводов, 2 глаза, 3 желчных пузыря, 6 сердец, 12 почек, 19 толстых кишок, 19 печеней, 45 легких, 7 лимфатических узлов, 8 нервов, 3 яичника, 8 поджелудочных желез, 3 паращитовидные железы, 1 брюшина, 5 гипофизов, 6 плацент, 3 плевры, 3 предстательные железы, 7 слюнных желез, 5 скелетных мышц, 12 образцов кожи, 3 тонкие кишки, 11 селезенки, 5 желудков, 4 семенника, 2 вилочковые железы, 2 щитовидные железы, 9 трахей, 6 мочеточников, 5 маток, 8 мочевых пузырей, 15 образцов рака мочевого пузыря. Кроме того, пептид был выявлен на клетках 3/15 раков мочевого пузыря. Фигура 1D: символ гена: DYNC1H, пептид: FVFEPPIGV (SEQ ID NO.: 113); ткани слева направо: 3 жировые ткани, 3 надпочечные железы, 16 клеток крови, 15 кровеносных сосудов, 9 костных мозгов, 10 головных мозгов, 7

молочных желез, 6 пищеводов, 2 глаза, 3 желчных пузыря, 6 сердец, 12 почек, 19 толстых кишок, 19 печеней, 45 легких, 7 лимфатических узлов, 8 нервов, 3 яичника, 8 поджелудочных желез, 3 паращитовидные железы, 1 брюшина, 5 гипофизов, 6 плацент, 3 плевры, 3 предстательные железы, 7 слюнных желез, 5 скелетных мышц, 12 образцов кожи, 3 тонкие кишки, 11 селезенки, 5 желудков, 4 семенника, 2 вилочковые железы, 2 щитовидные железы, 9 трахей, 6 мочеточников, 5 маток, 8 мочевых пузырей, 15 образцов рака мочевого пузыря. Кроме того, пептид был выявлен на клетках 2/15 раков мочевого пузыря. Фигура 1E: символ гена: SNRNP70, пептид: YLAPENGYLMEA (SEQ ID NO.: 15); ткани слева направо: 1 клеточная линия (1 почка), 25 раковых тканей (2 рака толстой кишки, 1 лейкоцитарный лейкоз, 3 рака печени, 6 раков легких, 3 рака лимфатических узлов, 3 рака предстательной железы, 2 рака кожи, 3 рака мочевого пузыря, 2 рака матки). 1F: пептид: GLWHGMFANV (SEQ ID NO.: 10); ткани слева направо: 8 клеточных линий (1 головы и шеи, 1 яичника, 2 лимфоцитов, 3 кожи, 1 головы и шеи), 1 нормальная ткань (1 селезенка), 25 раковых тканей (1 рак головного мозга, 1 лейкоцитарный лейкоз, 1 рак костного мозга, 1 рак молочной железы, 3 рака толстой кишки, 2 рака печени, 1 рак головы и шеи, 1 рак кожи, 2 рака яичника, 2 рака головного мозга, 7 раков легких, 3 рака мочевого пузыря); 1G: пептид: RLSQLEGVNV (SEQ ID NO.: 17); ткани слева направо: 7 клеточных линий (1 лимфоцит, 2 кожи, 4 поджелудочные железы), 1 нормальная ткань (1 надпочечная железа), 15 раковых тканей (1 рак печени, 2 рака головы и шеи, 2 рака яичника, 1 рак легких, 1 рак почки, 3 рака легких, 4 рака мочевого пузыря, 1 рак матки); 1H: пептид: GLALLYSGV (SEQ ID NO.: 26); ткани слева направо: 7 клеточных линий (1 мочевой пузырь, 3 лейкоцита, 3 поджелудочные железы), 1 нормальная ткань (1 легкое), 18 раковых тканей (1 рак костного мозга, 1 рак молочной железы, 1 лейкоцитарный лейкоз, 7 раков печени, 2 рака кожи, 1 рак желудка, 1 рак легких, 3 рака мочевого пузыря, 1 рак матки); 1I: пептид: GLIDSLMAYV (SEQ ID NO.: 28); ткани слева направо: 2 нормальные ткани (1 голова и шея, 1 вилочковая железа), 27 раковых тканей (11 раков головы и шеи, 1 рак кожи, 1 рак лимфатических узлов, 2 рака пищевода, 9 раков легких, 3 рака мочевого пузыря); 1J: пептид: SLIGGTNFV (SEQ ID NO.: 49); ткани слева направо: 3 нормальные ткани (2 лимфатических узла, 1 селезенка), 38 раковых тканей (1 рак

миелоидных клеток, 2 лейкоцитарных лейкоза, 1 рак костного мозга, 1 рак предстательной железы, 3 рака молочной железы, 1 лейкоцитарный лейкоз, 2 рака толстой кишки, 7 раков печени, 2 рака кожи, 8 раков лимфатических узлов, 1 рак пищевода, 4 рака легких, 3 рака мочевого пузыря, 2 рака матки); 1K: пептид: ILLRDLPTL (SEQ ID NO.: 56); ткани слева направо: 14 клеточных линий (9 лимфоцитов, 4 доброкачественных, 1 поджелудочная железа), 11 нормальных тканей (1 пищевод, 2 печени, 3 легких, 1 паращитовидная железа, 1 селезенка, 1 желудок, 1 щитовидная железа, 1 матка), 72 раковые ткани (17 раков предстательной железы, 4 рака молочной железы, 2 рака толстой кишки, 1 рак желчных протоков, 1 рак желчного пузыря, 1 рак печени, 2 рака головы и шеи, 1 рак кожи, 5 раков лимфатических узлов, 3 рака яичника, 2 рака пищевода, 1 рак пищевода и желудка, 1 рак желудка, 20 раков легких, 1 рак поджелудочной железы, 7 раков мочевого пузыря, 3 рака матки); 1L: пептид: GLDSSVNVQGSVL (SEQ ID NO.: 58); ткани слева направо: 2 клеточные линии (2 лейкоцита), 7 нормальных тканей (1 надпочечник, 1 лимфатический узел, 5 селезенки), 40 раковых тканей (1 рак толстой кишки, 1 рак желчных протоков, 1 рак печени, 2 рака головы и шеи, 2 рака кожи, 4 рака лимфатических узлов, 6 раков яичника, 1 рак пищевода и желудка, 1 рак желудка, 17 раков легких, 3 рака мочевого пузыря, 1 рак матки); 1M: пептид: HLLDSKVPSV (SEQ ID NO.: 85); ткани слева направо: 2 нормальные ткани (2 селезенки), 25 раковых тканей (1 рак толстой кишки, 2 рака печени, 2 рака головы и шеи, 2 рака яичника, 2 рака пищевода, 1 рак головного мозга, 12 раков легких, 3 рака мочевого пузыря); 1N: пептид: ALIGDDVGL (SEQ ID NO.: 99); ткани слева направо: 6 нормальных тканей (2 образца лейкоцитов, 1 образец лимфоцитов, 1 поджелудочная железа, 1 селезенка, 1 вилочковая железа), 34 раковые ткани (1 рак миелоидных клеток, 1 рак костного мозга, 2 лейкоцитарных лейкоза, 2 рака толстой кишки, 1 колоректальный рак, 1 рак желчного пузыря, 4 рака головы и шеи, 2 рака кожи, 2 рака лимфатических узлов, 2 рака яичника, 1 рак пищевода, 1 рак желудка, 9 раков легких, 4 рака мочевого пузыря, 1 рак матки); 1O: пептид: FVFEPPPGV (SEQ ID NO.: 113); ткани слева направо: 5 клеточных линий (1 кожа, 1 мочевой пузырь, 1 яичник, 2 поджелудочные железы), 25 раковых тканей (1 рак предстательной железы, 1 рак молочной железы, 1 рак печени, 2 рака головы и шеи, 6 раков кожи, 1

рак лимфатических узлов, 2 рака поджелудочной железы, 1 рак головного мозга, 2 рака желудка, 4 рака легких, 4 рака мочевого пузыря); 1P: пептид: QLQGYLRSV (SEQ ID NO.: 121); ткани слева направо: 10 клеточных линий (1 яичник, 2 первичные культуры, 1 линия лимфоцитов, 1 линия лейкоцитов, 1 почка, 2 прямые кишки, 2 поджелудочные железы), 7 нормальных тканей (1 надпочечник, 1 образец лейкоцитов, 3 костных мозга, 1 толстая кишка, 1 трахея), 36 раковых тканей (1 рак слепой кишки, 1 рак миелоидных клеток, 1 лейкоцитарный лейкоз, 4 рака толстой кишки, 1 рак прямой кишки, 1 рак желчных протоков, 5 раков печени, 6 раков головы и шеи, 1 рак лимфатических узлов, 1 рак пищевода, 1 рак поджелудочной железы, 1 рак головного мозга, 9 раков легких, 1 рак мочевого пузыря, 2 рака матки); 1Q: пептид: ILEPSLYTV (SEQ ID NO.: 122); ткани слева направо: 13 клеточных линий (1 почка, 2 линии лейкоцитов, 1 кожа, 9 поджелудочных желез), 10 нормальных тканей (1 надпочечник, 5 толстых кишок, 1 печень, 2 легких, 1 лимфатический узел), 63 раковые ткани (2 рака миелоидных клеток, 2 лейкоцитарных лейкоза, 1 рак костного мозга, 2 рак предстательной железы, 4 рака молочной железы, 2 лейкоцитарных лейкоза, 1 рак толстой кишки, 1 рак прямой кишки, 1 рак желчных протоков, 7 раков печени, 3 рака головы и шеи, 5 раков кожи, 2 рака лимфатических узлов, 2 рака яичника, 1 рак пищевода, 1 рак поджелудочной железы, 5 раков головного мозга, 4 рака желудка, 5 раков легких, 3 рака почки, 1 рак легких, 4 рака мочевого пузыря, 4 рака матки); 1R: пептид: YLEPKLTQV (SEQ ID NO.: 129); ткани слева направо: 25 клеточных линий (1 голова и шея, 1 яичник, 1 МКПК, 2 линии лимфоцитов, 3 кожи, 1 почка, 16 поджелудочных желез), 8 нормальных тканей (3 надпочечника, 1 костный мозг, 1 голова и шея и слюнная железа, 1 почка, 1 печень, 1 селезенка), 62 раковые ткани (1 рак миелоидных клеток, 1 рак костного мозга, 1 лейкоцитарный лейкоз, 3 рака предстательной железы, 1 рак молочной железы, 1 рак толстой кишки, 2 рака желчных протоков, 6 раков печени, 3 рака головы и шеи, 5 раков кожи, 2 рака лимфатических узлов, 3 рака яичника, 2 рака пищевода, 2 рака головного мозга, 1 рак желудка, 11 раков легких, 1 рак почки, 4 рака легких, 6 раков мочевого пузыря, 6 раков матки).

На Фигурах 2A–D представлены примеры профилей экспрессии исходных генов настоящего изобретения, которые в высокой степени экспрессированы в избытке или исключительно экспрессированы при раке мочевого пузыря в ряду нормальных тканей (белые столбцы) и 10 образцах рака мочевого пузыря (черные столбцы). Ткани слева направо: 6 артерий, 2 образца клеток крови, 2 головных мозга, 1 сердце, 2 печени, 3 легких, 2 вены, 1 жировая ткань, 1 надпочечная железа, 5 костных мозгов, 1 хрящевая ткань, 1 толстая кишка, 1 пищевод, 2 глаза, 2 желчных пузыря, 1 почка, 6 лимфатических узлов, 4 поджелудочные железы, 2 периферических нерва, 2 гипофиза, 1 прямая кишка, 2 слюнные железы, 2 скелетные мышцы, 1 кожа, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 щитовидная железа, 7 трахей, 1 мочевой пузырь, 1 молочная железа, 5 яичников, 5 плацент, 1 предстательная железа, 1 семенник, 1 вилочковая железа, 1 матка, 10 образцов рака мочевого пузыря. Фигура 2A: Символ гена: TMPRSS4; Фигура 2B: Символ гена: KRT7; Фигура 2C: Символ гена: CYP4F22; Фигура 2D: Символ гена: DHRS2.

На Фигуре 3 показаны типичные данные по иммуногенности: результаты проточного цитометрического анализа после пептид-специфического окрашивания мультимеров.

На Фигуре 4 представлены типичные результаты пептид-специфических ответов *in vitro* CD8⁺ Т-клеток здорового HLA-A*02⁺ донора. CD8⁺ Т-клетки примировали с помощью искусственных АПК, стимулированных моноклональными антителами к CD28 и HLA-A*02 в комплексе с пептидом с последовательностью SEQ ID NO: 30 (А, левая секция), пептидом с последовательностью SEQ ID NO: 50 (В, левая секция) и пептидом с последовательностью SEQ ID NO: 111 (С, левая секция), соответственно. После трех циклов стимуляции обнаружение клеток, реагирующих с пептидом, производилось с помощью двойного окрашивания мультимеров, используя A*02/SeqID No 30 (А), A*02/SeqID No 50 (В) или A*02/SeqID No 111 (С). Правые секции (А, В и С) представляют собой контрольное окрашивание клеток, простимулированных нерелевантными комплексами пептида и A*02. Из числа отдельных жизнеспособных клеток путем гейтирования выделяли CD8⁺

лимфоциты. Гейты Буля помогали исключить ложно-положительные ответы, обнаруженные с помощью мультимеров, специфических в отношении различных пептидов. Указывается частота выявления специфических мультимер-положительных клеток среди CD8+ лимфоцитов.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1:

Идентификация и количественное определение опухолеассоциированных пептидов, презентруемых на поверхности клетки

Образцы тканей

Опухолевые ткани пациентов были получены из: компаний Asterand (Детройт, Мичиган, США и Ройстон, Хартфордшир, Великобритания); Geneticist Inc. (Глендейл, Калифорния, США); ProteoGenex Inc. (Кальвер-Сити, Калифорния, США); Tissue Solutions Ltd (Глазго, Великобритания) и Университетской клиники г. Тюбинген (Тюбинген, Германия)

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

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

Выделение пептидов HLA из образцов тканей

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

Масс-спектрометрический анализ

Полученные пулы комплексов пептид-HLA были разделены в соответствии с их гидрофобностью обратнофазовой хроматографией (nanoAcquity UPLC system, Waters), и элюированные пептиды анализировали на гибридных масс-спектрометрах LTQ-velos и -fusion (ThermoElectron), снабженном источником ESI. Пулы пептидов наносили непосредственно на аналитическую микрокапиллярную колонку из плавленого кварца (75 мкм в/д 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. Тандемные масс-спектры интерпретировали при помощи программы SEQUEST с дополнительным контролем вручную. Идентифицированную пептидную последовательность подтверждали сравнением полученной картины фрагментации природного пептида с картиной фрагментации синтетического контрольного пептида с идентичной последовательностью.

Относительное количественное определение методом ЖХ/МС без изотопных меток проводили путем подсчета ионов, т. е. с помощью экстракции и анализа результатов ЖХ/МС (Mueller et al., 2007). Этот метод основан на предположении, что площадь пика ЖХ/МС сигнала пептида коррелирует с его концентрацией в образце. Извлеченные характеристики обрабатывали с помощью деконволюционного анализа состояния заряда и путем выравнивания времени удерживания (Mueller et al., 2008; Sturm et al., 2008). Наконец, все результаты спектров ЖХ/МС были сопоставлены методом перекрестных ссылок с результатами по идентификации последовательности, чтобы объединить количественные данные различных образцов и тканей в профили презентации пептидов. Количественные данные были нормализованы с применением двухуровневой системы в соответствии с центральной тенденцией с целью учета вариабельности внутри технических и биологических повторных измерений. Таким образом, каждый идентифицированный пептид может быть ассоциирован с количественными данными, позволяющими провести относительную количественную оценку образцов и тканей. Кроме того, все количественные данные, полученные для пептидов-кандидатов, были проконтролированы вручную в целях обеспечения взаимосогласованности данных и для проверки точности автоматического метода анализа. Для каждого пептида был рассчитан профиль презентации, показывающий средний уровень презентации в образце, а также вариабельность репликатов. В профиле сравниваются образцы различных тканей рака мочевого пузыря с фоновым уровнем образцов нормальной ткани. Профили презентации типичных пептидов, презентируемых в избытке, показаны на Фигуре 1. Показатели презентации отдельных пептидов показаны в Таблице 8.

Таблица 8: Показатели презентации. В таблице представлены пептиды, которые в очень высокой степени избыточно презентуются на опухолях в сравнении с панелью нормальных тканей (+++), в высокой степени избыточно презентуются на опухолях в сравнении с панелью нормальных тканей (++) или избыточно презентуются на опухолях в сравнении с панелью нормальных тканей (+). Панель нормальных тканей, рассматриваемых как пригодные для сравнения с опухолями, были: жировая ткань, ткань надпочечной железы, клетки крови, кровеносные сосуды, ткань костного мозга, головного мозга, ткань пищевода, глаз, желчного пузыря, сердца, почек, толстой кишки, печени, легких, лимфатических узлов, нервная ткань, ткань поджелудочной железы, паращитовидной железы, брюшины, гипофиза, плевры, слюнной железы, скелетных мышц, кожа, ткань тонкой кишки, селезенки, желудка, вилочковой железы, щитовидной железы, трахеи, мочеточника, мочевого пузыря.

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептида
1	ILLQASVQV	+++
2	GLLKAYSIRTA	+++
3	YLDEIPPKFSM	+++
4	SLDVVNLLV	+++
6	SIVDFLITA	+++
7	QMFEGQILDV	+++
8	ALSFSSSAGPGLLKA	+++
9	SLVDARFQL	+++
10	GLWHGMFANV	+++
11	AMAELRVVV	++
12	GVALTVTGV	+++
13	FLEEKEQAAL	+++
14	GLAGPVRGV	+++
15	YLAPENGYLMEA	+++
16	ILGPQGNTI	+++

17	RLSQLEGVNV	+
18	SIAAYNPVV	+++
19	SLATTLTKI	+++
20	YLPDSLTLQL	+++
21	TLIEDDALNGA	+++
23	YTLSKTEFL	+++
24	SLLGGITVV	++
28	GLIDSLMAYV	+++
30	ILDISRSEV	+++
31	SLFDGIATGL	+++
33	VLFGEITRL	++
34	ALLDEQQVNV	++
35	KLPEPPPLA	+++
36	ALWDEFNQL	+++
37	ILSAILVHL	+++
38	TLTSIIVAV	+++
40	VIADRVVTV	+++
41	FLDDGNQMLL	+++
42	FLIDASQRV	+++
43	FLIESKLLSL	+++
44	GLAQDPKSLQL	+++
45	IIDSSPTAL	+++
46	SLFIGAEIVAV	+++
47	VLMDDTDPL	+++
48	VLMDDTDPLV	+++
49	SLIGGTNFV	++
50	VLANRVAVV	+
51	ALLDKAQINL	++
53	ILVQVIPVV	+++
54	ALNDEINFL	+++

55	KLLETKWTL	+
56	ILLRDLPTL	++
57	GLAHFVNEI	++
58	GLDSSVNVQGSVL	+++
59	WLSTSIPEA	++
60	SLSDVRVIV	++
62	GQLDFSEFL	+
63	LLAGLLVGV	+++
64	GLLSQGSPL	+++
65	IITDLLRSV	+++
66	SLWEENQAL	++
67	FLTPPLLSV	+++
68	TMIVSLAAV	++
69	QIWDKILSV	+
70	KLAEISLGV	+++
73	VLKVFLENV	++
74	LLQEGEVYSA	+
77	KVFGGFQVV	++
80	ILLDTPLFLL	+++
81	SLDKGTLYI	++
82	NLHNSYYSV	+
83	VILDKYYFL	+
84	ALDPASISV	+
87	RLLELLQEA	++
89	YLPETEFI	+
91	NLDAATYQV	+
92	ALLDEQQVNVLL	+
94	ALADGVPVAL	++
96	KLTNGIWVL	+
97	TVGPGLLGV	++

98	YLIGLDPENLAL	++
99	ALIGDDVGL	++
100	SLQSFIHGV	+
102	GLYEGLDWL	+++
103	GLYSGEVLV	+
104	NAVVELVTV	++
106	ILLDTPLFL	+
107	LULAKLEKV	+++
110	VLFNIDGQGNHV	+++
111	LLDVTPKAV	+++
112	YLDPSLNSL	+++
113	FVFEPPPGV	+++
114	IITKDLFQV	+++
115	SLLDFERSL	+++
116	QLAWFDTD	+
117	YMLDIFHEVL	+++
118	RLLDFPTLLV	+++
119	SLDEKQNLV	+++
120	IIPEIQKV	++
121	QLQGYLRSV	++
122	ILEPSLYTV	+++
123	NLAGVYSEV	++
124	QIDGTLSTI	++
125	VLDEGSASV	++
126	SLLRVGWSV	++
129	YLEPKLTQV	++
130	TLTSKLYSL	+
132	YILEGEPGKV	++
133	GLDPLGYEIQ	+
134	IVAPGTFEV	+

135	FLLPLIIVL	+++
136	GLSEPIFQL	+++
137	ALFPHLLQPVL	++
138	YLTNEGIQYL	++
139	LLYPTEITV	+++
140	ALLDGRVQL	++
141	SMFGAGLTV	+
142	FLGENISNFL	+++
143	TLVTGLASV	+
146	YLARIQGFQV	+
147	QMLELITRL	+
149	VLLRVLILL	+

ПРИМЕР 2:

Определение профиля экспрессии генов, кодирующих пептиды по изобретению

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

Источники и приготовление РНК

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

Суммарная РНК здоровых тканей человека для экспериментов по секвенированию РНК (RNASeq) была получена из:

Asterand (Детройт, Мичиган, США и Ройстон, Хартфордшир, Великобритания), BioCat GmbH (Гейдельберг, Германия), BioServe (Белтсвилль, Мэриленд, США); Capital BioScience Inc. (Поквилль, Мэриленд, США), Geneticist Inc. (Глендейл, Калифорния, США), Istituto Nazionale Tumori «Pascale» (Неаполь, Италия),

ProteoGenex Inc. (Кальвер-Сити, Калифорния, США) и Университетской клиники г. Гейдельберг (Гейдельберг, Германия).

Суммарная РНК опухолевых тканей для экспериментов RNASeq была получена из: компаний Asterand (Детройт, Мичиган, США и Ройстон, Хартфордшир, Великобритания); Geneticist Inc. (Глендейл, Калифорния, США); ProteoGenex Inc. (Кальвер-Сити, Калифорния, США); Tissue Solutions Ltd (Глазго, Великобритания).

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 клетках рака мочевого пузыря, представлены на Фигуре 2. Показатели экспрессии других отдельных генов показаны в Таблице 9.

Таблица 9: 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, артерия, клетки крови, костный мозг, головной мозг, хрящевая ткань, толстая кишка, пищевод, глаз, желчный пузырь, сердце, почка, печень, легкие, лимфатический узел, поджелудочная железа, периферический нерв, гипофиз, прямая кишка, слюнная железа, скелетная мышца, кожа, тонкая кишка, селезенка, желудок, щитовидная железа, трахея, мочевого пузырь и вена. В случае, если в наличии имелись данные для нескольких образцов одного и того же вида ткани, для расчетов использовали среднее арифметическое всех соответствующих образцов.

SEQ ID No.	Последовательность	Экспрессия гена
1	ILLQASVQV	+++
2	GLLKAYSIRTA	+++
3	YLDEIPPKFSM	++
4	SLDVVNLLV	++
5	IQDPVIFYV	+
6	SIVDFLITA	+
8	ALSFSSSAGPGLLKA	+++
11	AMAELRVVV	+++
18	SIAAYNPVV	+++
21	TLIEDDALNGA	++
22	SIAKEGVVGA	++

34	ALLDEQQVNV	+++
35	KLPEPPPLA	+++
36	ALWDEFNQL	+++
37	ILSAILVHL	+++
38	TLTSIIVAV	+++
40	VIADRVVTV	+
46	SLFIGAEIVAV	+
50	VLANRVAVV	+++
53	ILVQVIPVV	+
54	ALNDEINFL	+++
55	KLLETKWTL	+++
56	ILLRDLPTL	+++
69	QIWDKILSV	+++
76	AVVSSVNTV	++
83	VILDKYYFL	+++
85	HLLDSKVPSV	++
87	RLLELLQEA	+++
89	YLPETEFI	++
92	ALLDEQQVNVLL	+++
100	SLQSFIHGV	+++
109	RLIDDMVAQA	+
110	VLFNIDGQGNHV	+++
117	YMLDIFHEVL	+++
124	QIDGTLSTI	+
135	FLLPLIIVL	+
139	LLYPTEITV	++
140	ALLDGRVQL	+++
142	FLGENISNFL	+++
149	VLLRVLILL	++

ПРИМЕР 3:

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

Для получения информации об иммуногенности пептидов TUMAP по настоящему изобретению заявители провели исследования с использованием прайминга Т-клеток *in vitro* на основе повторных стимуляций CD8⁺ Т-клеток искусственными антигенпрезентирующими клетками (иАПК), нагруженными комплексами пептид-МНС и антителом к CD28. Таким образом заявители могли показать иммуногенность для рестриктированных по HLA-A*0201 пептидов TUMAP по изобретению, демонстрируя, что эти пептиды являются Т-клеточными эпитопами, против которых у человека имеются CD8⁺ Т-клетки-предшественники (Таблица 10).

Прайминг CD8⁺ Т-клеток *in vitro*

В целях проведения стимуляций *in vitro* искусственными антигенпрезентирующими клетками, нагруженными комплексом пептид-МНС (pMHC) и антителом к CD28, заявители сначала выделили CD8⁺ Т-клетки из свежего продукта лейкофереза HLA-A*02 методом позитивной селекции с помощью микросфер CD8 (Miltenyi Biotec, Бергш-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. 206) из модифицированного Melan-A/MART-1) и A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI из DDX5, SEQ ID NO. 207), 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 4 дней при 37°C. Данный цикл стимуляций производили в общей сложности три раза. Для считывания с рМНС-мультимеров использовали 8 различных молекул рМНС на цикл. Использовался двумерный комбинаторный подход к кодировке, как было описано ранее (Andersen et al., 2012) с незначительными изменениями, относящимися к мечению с 5 различными флуорохромами. Наконец, проводили анализ мультимеров посредством окрашивания клеток набором для определения жизнеспособности клеток при воздействии ближнего ИК-излучения с красителем Live/dead (Invitrogen, Карлсруэ, Германия), клоном SK1 антител CD8-FITC (BD, Гейдельберг, Германия) и

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

Иммуногенность *in vitro* для пептидов рака мочевого пузыря

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 2 пептидов по изобретению показаны на Фиг. 3 вместе с соответствующими отрицательными контролями. Типичные результаты проточного цитометрического анализа после TUMAP-специфического окрашивания мультимеров для 3 пептидов по изобретению показаны на Фиг. 4 вместе с соответствующими отрицательными контролями. Результаты для 25 пептидов по изобретению обобщаются в Таблице 10А. Дополнительные результаты для 26 пептидов по изобретению обобщаются в Таблице 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	Лунки
155	VLSSGLTAA	+
156	KLVEFDLGA	+
159	SLIEDLILL	+
160	SLLGGNIRL	++
162	TLLAAEFLKQV	+
164	ALADLTGTVV	+
167	SLWGGDVVL	++
168	LTAPPEALLMV	+
170	GLIEIISNA	+
172	LLYGHTVTV	++
173	FVFSFPVSV	++
176	SMSGYDQVL	+
177	NLLQVLEKV	+
178	ALNEEAGRLLL	+
182	YLAPFLRNV	++
184	LMTKEISSV	+
186	VLYPHEPTAV	+
189	ALLRTVVSV	+
192	ALNPADITV	++
193	ALVQDLAKA	++
198	NLIEKSIYL	+
200	YLVNQVKEL	+
203	FLIPYAIML	+
204	GVYDGEEHSV	+
205	KIVDFSYSV	++

Таблица 10Б: Иммуногенность пептидов по изобретению HLA I класса *in vitro*. Отдельные результаты экспериментов по иммуногенности *in vitro*, проведенных заявителем для рестриктированных по HLA-A*02 пептидов по изобретению. Указаны результаты экспериментов по иммуногенности *in vitro*. Процентные доли положительных лунок и доноров (среди подлежащих оценке) обобщены согласно следующему критерию: <20 % = +; 20 %-49 % = ++; 50 %-69 % = +++ ; >= 70 % = ++++

SEQ ID NO:	Последовательность	Положительные лунки [%]
4	SLDVVNLLV	+
5	IQDPVIFYV	+++
6	SIVDFLITA	+
9	SLVDARFQL	+
10	GLWHGMFANV	++
14	GLAGPVIRGV	+
15	YLAPENGYLMEA	+
16	ILGPQGNTI	+
17	RLSQLEGVNV	+
23	YTLSTEFL	+
24	SLLGGITVV	++
27	STTNGGILTV	+
29	ALSSPPPTV	+
30	ILDISRSEV	++++
41	FLDDGNQMLL	+
50	VLANRVAVV	++++
53	ILVQVIPVV	++
57	GLAHFVNEI	+
59	WLSTSIPEA	+
60	SLSDVRVIV	+
75	RVISSVISV	++
111	LLDVTPKAV	+++
114	IITKDLFQV	+
126	SLLRVGWSV	++
146	YLARIQGFQV	++
148	TLGVIPESV	+

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 2% БСА, содержащем блокирующий буфер. Полученные в результате рефолдинга мономеры HLA-A*02:01/MLA-001 служили в качестве стандарта, покрывающего диапазон 15-500 нг/мл. Мономерные комплексы пептид-МНС после реакции обмена под воздействием УФ-излучения 100-кратно разводили в блокирующем буфере. Образцы инкубировали в течение 1 ч при 37°C, промывали четыре раза, инкубировали в течение 1 ч при 37°C с 2 мкг/мл

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

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

SEQ ID No	Последовательность	Пептидный обмен
1	ILLQASVQV	++++
2	GLLKAYSIRTA	+++
3	YLDEIPPKFSM	++++
4	SLDVVNLLV	++++
5	IQDPVIFYV	++++
6	SIVDFLITA	+++
7	QMFEGQILDV	+++
8	ALSFSSSAGPGLLKA	+++
9	SLVDARFQL	++++
10	GLWHGMFANV	++++
11	AMAELRVVV	++++
12	GVALTVTGV	++++
13	FLEEKEQAAL	+++
14	GLAGPVRGV	+++
15	YLAPENGYLMEA	+++
16	ILGPQGNTI	+++
17	RLSQLEGVNV	+++
18	SIAAYNPVV	++++
19	SLATTITKI	+++
20	YLPDSLTLQ	++++
21	TLIEDDALNGA	+++
23	YTLSTEFL	++++
24	SLLGGITVV	++++
25	SLDSSGFSL	+++
26	GLALLYSGV	++++
27	STTNGGILTV	+++
28	GLIDSLMAYV	++++
29	ALSSPPPTV	+++
30	ILDISRSEV	+++
31	SLFDGIATGL	++++
32	YQAPDIDVQL	+++
33	VLFGITRL	+++
34	ALLDEQQVNV	+++
35	KLPEPPPLA	+++
36	ALWDEFNQL	+++
37	ILSAILVHL	+++
38	TLTSIIVAV	+++
39	AMASHLTST	+++
40	VIADRVVTV	+++
41	FLDDGNQMLL	++++
42	FLIDASQRV	+++
43	FLIESKLLSL	++++
44	GLAQDPKSLQL	+++

45	IIDSSPTAL	++
47	VLMDDTDPL	+++
48	VLMDDTDPLV	+++
49	SLIGGTNFV	+++
50	VLANRVAVV	+++
52	SLATLEGIQL	+++
53	ILVQVIPVV	+++
54	ALNDEINFL	+++
55	KLLETKWTL	++++
56	ILLRDLPTL	+++
57	GLAHFVNEI	++++
58	GLDSSVNVQGSVL	+++
59	WLSTSIPEA	++++
60	SLSDVRVIV	++++
62	GQLDFSEFL	+++
63	LLAGLLVGV	+++
64	GLLSQGSPL	+++
65	IITDLLRSV	++++
66	SLWEENQAL	+++
67	FLTPPLLSV	++++
68	TMIVSLAAV	+++
69	QIWDKILSV	+++
70	KLAEISLGV	++
71	LLSEDFVSV	++
72	SLFTGLRSI	+++
73	VLKVFLENV	++++
74	LLQEGEVYSA	+++
75	RVISSVISV	+++
76	AVVSSVNTV	+++
77	KVFGGFQVV	++++
78	FIPDFAVAI	++++
79	FLDPATPRV	+++
80	ILLDTPLFLL	+++
81	SLDKGTLYI	+++
82	NLHNSYYSV	+++
83	VILDKYYFL	++++
84	ALDPASISV	+++
85	HLLDSKVPSV	+++
86	FLIJLIISV	+++
87	RLLELLQEA	++++
88	ALASLENHV	+++
89	YLPETEFI	+++
90	GMTELYFQL	+++
91	NLDAATYQV	+++
92	ALLDEQQVNVLL	+++

93	LLDLIQTKV	+++
94	ALADGVPVAL	+++
95	YLIGQHVT	++++
96	KLTNGIWVL	+++
97	TVGPGLLGV	+++
98	YLIGLDPENLAL	+++
99	ALIGDDVGL	+++
100	SLQSFIHGV	+++
101	ILDEMRAQL	+++
102	GLYEGLDWL	+++
103	GLYSGEVLV	++++
105	TLFPSKIGV	+++
106	ILLDTPLFL	+++
107	LULAKLEKV	++
108	YLDPNQRDL	+++
109	RLIDDMVAQA	+++
110	VLFNIDGQGNHV	+++
111	LLDVTPKAV	+++
112	YLDPSLNSL	+++
113	FVFEPPIGV	++++
114	IITKDLFQV	+++
115	SLLDFERSL	+++
116	QLAWFDTDL	+++
117	YMLDIFHEVL	+++
118	RLLDFPTLLV	+++
119	SLDEKQNLV	+++
120	IIPEIQKV	+++
121	QLQGYLRSV	+++
122	ILEPSLYTV	++++
123	NLAGVYSEV	++++
124	QIDGTLSTI	+++
126	SLLRVGWSV	++++
127	KLNATNIEL	+++
128	KLWGQSIQL	++++
129	YLEPKLTQV	+++
130	TLTSKLYSL	++++
131	ILTSIQSLL	++++
132	YILEGEPGKV	++++
133	GLDPLGYEIQ	++++
134	IVAPGTFEV	+++
135	FLLPLIIVL	+++
136	GLSEPIFQL	+++
137	ALFPHLLQPV	++++
138	YLTNEGIQYL	+++
139	LLYPTTEIV	+++

140	ALLDGRVQL	++++
141	SMFGAGLTV	++++
142	FLGENISNFL	+++
143	TLVTGLASV	+++
144	YLAGEAPTL	+++
145	ALYPGQLVQL	+++
146	YLARIQGFQV	++++
147	QMLELITRL	+++
148	TLGVIPEVS	++++

Список цитируемой литературы

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

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

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

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

Arafat, H. et al., Surgery **150** (2011): 306-315

Azevedo, R. et al., J Control Release **214** (2015): 40-61

Banchereau, J. et al., Cell **106** (2001): 271-274

Beatty, G. et al., J Immunol **166** (2001): 2276-2282

Beggs, J. D., Nature **275** (1978): 104-109

Benjamini, Y. et al., Journal of the Royal Statistical Society.Series B (Methodological), **Vol.57** (1995): 289-300

Bidkhor, G. et al., PLoS.One. **8** (2013): e67552

Boulter, J. M. et al., Protein Eng **16** (2003): 707-711

Braumuller, H. et al., Nature (2013)

Brody, J. R. et al., Cancer Biol Ther. (2016): 0

Brossart, P. et al., Blood **90** (1997): 1594-1599

Bruckdorfer, T. et al., Curr.Pharm.Biotechnol. **5** (2004): 29-43

Cahill, D. P. et al., CNS.Oncol **4** (2015): 287-294

Card, K. F. et al., Cancer Immunol.Immunother. **53** (2004): 345-357

- Chang, W. et al., *Int.J Cancer* **125** (2009): 2844-2853
- Chanock, S. J. et al., *Hum.Immunol.* **65** (2004): 1211-1223
- 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
- Daugaard, I. et al., *Sci.Rep.* **6** (2016): 35807
- Davis, J. E. et al., *Oncotarget.* (2016)
- 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
- 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
- Fuge, O. et al., *Res Rep.Urol.* **7** (2015): 65-79
- Gabrilovich, D. I. et al., *Nat.Med* **2** (1996): 1096-1103
- Gandhi, A. V. et al., *Ann Surg.Oncol* **20 Suppl 3** (2013): S636-S643
- Gardina, P. J. et al., *BMC.Genomics* **7** (2006): 325
- Gattinoni, L. et al., *Nat.Rev.Immunol.* **6** (2006): 383-393
- Georgiou, G. K. et al., *World J Surg.Oncol* **11** (2013): 213
- 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
- Green, M. R. et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* **4th** (2012)
- Greenfield, E. A., *Antibodies: A Laboratory Manual* **2nd** (2014)
- Grivas, P. D. et al., *Semin.Cancer Biol* **35** (2015): 125-132

- Gustafsson, C. et al., Trends Biotechnol. **22** (2004): 346-353
- Harris, T. M. et al., Arch.Pathol.Lab Med. **139** (2015): 494-507
- Huang, Q. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **101** (2004): 3456-3461
- Hwang, M. L. et al., J Immunol. **179** (2007): 5829-5838
- Jang, S. Y. et al., Cancer Lett. **314** (2012): 185-197
- Jones, R. T. et al., Urol.Clin North Am. **43** (2016): 77-86
- Jung, G. et al., Proc Natl Acad Sci U S A **84** (1987): 4611-4615
- Kang, C. Y. et al., J Gastrointest.Surg. **18** (2014): 7-15
- Kaz, A. M. et al., Genes Chromosomes.Cancer **51** (2012): 384-393
- Kibbe, A. H., Handbook of Pharmaceutical Excipients **rd** (2000)
- Knollman, H. et al., Ther.Adv.Urol. **7** (2015a): 312-330
- Knollman, H. et al., Ther.Adv.Urol. **7** (2015b): 312-330
- Krieg, A. M., Nat.Rev.Drug Discov. **5** (2006): 471-484
- Kuball, J. et al., Blood **109** (2007): 2331-2338
- Leivo, I. et al., Cancer Genet.Cytogenet. **156** (2005): 104-113
- Li, Y. et al., Mol.Biol Rep. **40** (2013): 4543-4551
- 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
- Morgan, R. A. et al., Science **314** (2006): 126-129
- Mori, M. et al., Transplantation **64** (1997): 1017-1027

- Mortara, L. et al., Clin Cancer Res. **12** (2006): 3435-3443
- Mostafa, W. Z. et al., J Cutan.Pathol. **37** (2010): 68-74
- 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
- National Cancer Institute, (5-6-2015), www.cancer.gov
- Oeda, S. et al., Int.J Dev.Biol **57** (2013): 383-389
- Otani, K. et al., J Pathol. **234** (2014): 302-315
- Papagerakis, S. et al., Hum.Pathol. **34** (2003): 565-572
- Persson, F. et al., Cancer Lett. **260** (2008): 37-47
- Pinheiro, J. et al., nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models (<http://CRAN.R-project.org/package=nlme>) (2015)
- Plebanski, M. et al., Eur.J Immunol **25** (1995): 1783-1787
- Porta, C. et al., Virology **202** (1994): 949-955
- Rammensee, H. G. et al., Immunogenetics **50** (1999): 213-219
- Rauch, T. A. et al., Tumour.Biol **33** (2012): 287-296
- 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
- Rouanne, M. et al., Crit Rev Oncol Hematol. **98** (2016): 106-115
- Saiki, R. K. et al., Science **239** (1988): 487-491
- Sanchez-Palencia, A. et al., Int.J Cancer **129** (2011): 355-364
- Schlienger, S. et al., Mol.Biol Cell **25** (2014): 17-29
- Schlienger, S. et al., Oncotarget. **7** (2016): 15811-15827
- Schmitt, T. M. et al., Hum.Gene Ther. **20** (2009): 1240-1248
- Schmitt-Graeff, A. et al., Histopathology **51** (2007): 87-97

- Scholten, K. B. et al., Clin Immunol. **119** (2006): 135-145
- Scotto, L. et al., Genes Chromosomes.Cancer **47** (2008): 755-765
- Seeger, F. H. et al., Immunogenetics **49** (1999): 571-576
- SEER Stat facts, (2014), <http://seer.cancer.gov/>
- Sherman, F. et al., Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics (1986)
- Sherman-Baust, C. A. et al., Cancer Cell **3** (2003): 377-386
- Shi, J. et al., Xi.Bao.Yu Fen.Zi.Mian.Yi.Xue.Za Zhi. **32** (2016): 360-363
- Simonova, O. A. et al., Mol.Biol (Mosk) **49** (2015): 667-677
- Singh-Jasuja, H. et al., Cancer Immunol.Immunother. **53** (2004): 187-195
- Small, E. J. et al., J Clin Oncol. **24** (2006): 3089-3094
- Smith, M. J. et al., Br.J Cancer **100** (2009): 1452-1464
- So, P. L. et al., Mech.Dev. **84** (1999): 157-160
- Sobolik-Delmaire, T. et al., Cell Commun.Adhes. **14** (2007): 99-109
- Steinberg, R. L. et al., Urol.Oncol (2016a)
- Steinberg, R. L. et al., Urol.Oncol (2016b)
- Sturm, M. et al., BMC.Bioinformatics. **9** (2008): 163
- Tan, X. et al., Exp.Ther.Med **1** (2010): 211-216
- Teufel, R. et al., Cell Mol.Life Sci. **62** (2005): 1755-1762
- Thorsen, K. et al., Mol.Cell Proteomics. **7** (2008): 1214-1224
- Tokar, E. J. et al., Chem Res Toxicol. **26** (2013): 96-105
- Tran, E. et al., Science **344** (2014): 641-645
- Unger, K. et al., Endocr.Relat Cancer **17** (2010): 87-98
- von Rundstedt, F. C. et al., Transl.Androl Urol. **4** (2015): 244-253
- Walter, S. et al., J.Immunol. **171** (2003): 4974-4978
- Walter, S. et al., Nat Med. **18** (2012): 1254-1261

- Willcox, B. E. et al., Protein Sci. **8** (1999): 2418-2423
- Xie, X. et al., Oncol Lett. **7** (2014): 1537-1543
- Yang, C. et al., Tumour.Biol (2015)
- Yang, S. et al., Biochim.Biophys.Acta **1772** (2007): 1033-1040
- Yu, J. et al., Gut **64** (2015): 636-645
- Zaremba, S. et al., Cancer Res. **57** (1997): 4570-4577
- Zhang, H. et al., Cancer Genet. **208** (2015a): 482-491
- Zhang, X. Q. et al., J Neurooncol. **125** (2015b): 253-263
- Zhang, Z. et al., Hum.Mol.Genet. **20** (2011): 4167-4174
- 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. 64, с SEQ ID No. 2 по SEQ ID No. 63, с SEQ ID No. 65 по SEQ ID No. 149, и варианты последовательности, которые по меньшей мере на 88% гомологичны последовательностям с SEQ ID No. 64, с SEQ ID No. 2 по SEQ ID No. 63, с SEQ ID No. 65 по SEQ ID No. 149, 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 указанный пептид не является полипептидом полной длины.
2. Пептид или его вариант в соответствии с п. 1, где указанный пептид или его вариант 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 и, где указанный пептид или его вариант имеет общую длину от 8 до 100, предпочтительно от 8 до 30, и более предпочтительно 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. 64, с SEQ ID No. 2 по SEQ ID No. 63, с SEQ ID No. 65 по SEQ ID No. 149.
3. Пептид или его вариант в соответствии пп. 1 или 2, где указанный пептид модифицирован и/или включает непептидные связи.
4. Пептид или его вариант в соответствии с любым из пп. 1–3, где указанный пептид является частью слитого белка, в частности, включающим N-терминальные аминокислоты антиген-ассоциированной инвариантной цепи (Ii) HLA-DR.

5. 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. 1–4, предпочтительно пептид или его вариант в соответствии с любым из пп. 1–4, когда он связан с молекулой МНС.

6. Т-клеточный рецептор (TCR), 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. 1–4, предпочтительно пептидом или его вариантом в соответствии с любым из пп. 1–4, когда он связан с молекулой МНС, где указанный лиганд имеет по меньшей мере 88% идентичности к любой из последовательностей с SEQ ID No. 64, с SEQ ID No. 2 по SEQ ID No. 63, с SEQ ID No. 65 по SEQ ID No. 149, или где указанный лиганд содержит аминокислотную последовательность, состоящую из любой из последовательностей SEQ ID No. 64, с SEQ ID No. 2 по SEQ ID No. 63, с SEQ ID No. 65 по SEQ ID No. 149, факультативно, где указанный Т-клеточный рецептор представлен в виде растворимой молекулы и обладает дополнительной эффекторной функцией, например, несет иммуностимулирующий домен или токсин.

7. Нуклеиновая кислота, кодирующая пептид или его вариант в соответствии с любым из пп. 1–4, антитело или его фрагмент в соответствии с п. 5, Т-клеточный рецептор или его фрагмент в соответствии с п. 6, факультативно связанная с гетерологичной последовательностью промотора, или вектор экспрессии, экспрессирующий указанную нуклеиновую кислоту.

8. Рекомбинантная клетка-хозяин, включающая пептид в соответствии с любым из пп. 1–4, антитело или его фрагмент в соответствии с п. 5, Т-клеточный рецептор или его фрагмент в соответствии с п. 6 или нуклеиновую кислоту или вектор экспрессии в соответствии с п. 7, где указанная клетка-хозяин предпочтительно

является антигенпрезентирующей клеткой, такой как дендритная клетка, Т-клетка или NK-клетка.

9. Активированный Т-лимфоцит, полученный с помощью способа, включающего 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.

10. Фармацевтическая композиция, включающая по меньшей мере один активный ингредиент, выбранный из группы, состоящей из пептида в соответствии с любым из пп. 1–4, антитела или его фрагмента в соответствии с п. 5, Т-клеточного рецептора или его фрагмента в соответствии с п. 6, нуклеиновой кислоты или вектора экспрессии в соответствии с п. 7, клетки-хозяина в соответствии с п. 8 или активированного Т-лимфоцита в соответствии с п. 9 или конъюгированного или меченного активного ингредиента и фармацевтически приемлемого носителя, и факультативно фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ и/или стабилизаторов.

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

12. Применение пептида в соответствии с любым из пп. 1–4, антитело или его фрагмент в соответствии с п. 5, Т-клеточный рецептор или его фрагмент в

соответствии с п. 6, нуклеиновая кислота или вектор экспрессии в соответствии с п. 7, клетка-хозяин в соответствии с п. 8 или активированный Т-лимфоцит в соответствии с п. 9 в диагностике и/или лечении рака или в производстве медикамента против рака.

13. Применение в соответствии с п. 12, где указанное раковое заболевание выбирается из группы: рак яичника, гепатоклеточная карцинома, колоректальная карцинома, глиобластома, рак желудка, рак пищевода, немелкоклеточный рака легких, мелкоклеточный рак легких, рак поджелудочной железы, почечноклеточная карцинома, рак предстательной железы, меланома, рак молочной железы, хронический лимфоцитарный лейкоз, неходжкинская лимфома, острый миелоидный лейкоз, рак желчного пузыря и холангиокарцинома, рак мочевого пузыря, рак матки, плоскоклеточная карцинома головы и шеи, мезотелиома и другие опухоли, которые демонстрируют избыточную экспрессию белка, из которого получен пептид с последовательностью выбранной из группы состоящей из SEQ ID No. 64, с SEQ ID No. 2 по SEQ ID No. 63, с SEQ ID No. 65 по SEQ ID No. 149.

14. Комплект, включающий:

- а) контейнер, включающий фармацевтическую композицию, содержащую пептид(ы) или вариант в соответствии с любым из пп. 1–4, антитело или его фрагмент в соответствии с п. 5, Т-клеточный рецептор или его фрагмент в соответствии с п. 6, нуклеиновую кислоту или вектор экспрессии в соответствии с п. 7, клетку-хозяин в соответствии с п. 8 или активированный Т-лимфоцит в соответствии с п. 9 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 пептидов в соответствии с SEQ ID No. 64, с SEQ ID No. 2 по SEQ ID No. 63, с SEQ ID No. 65 по SEQ ID No. 205, и

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

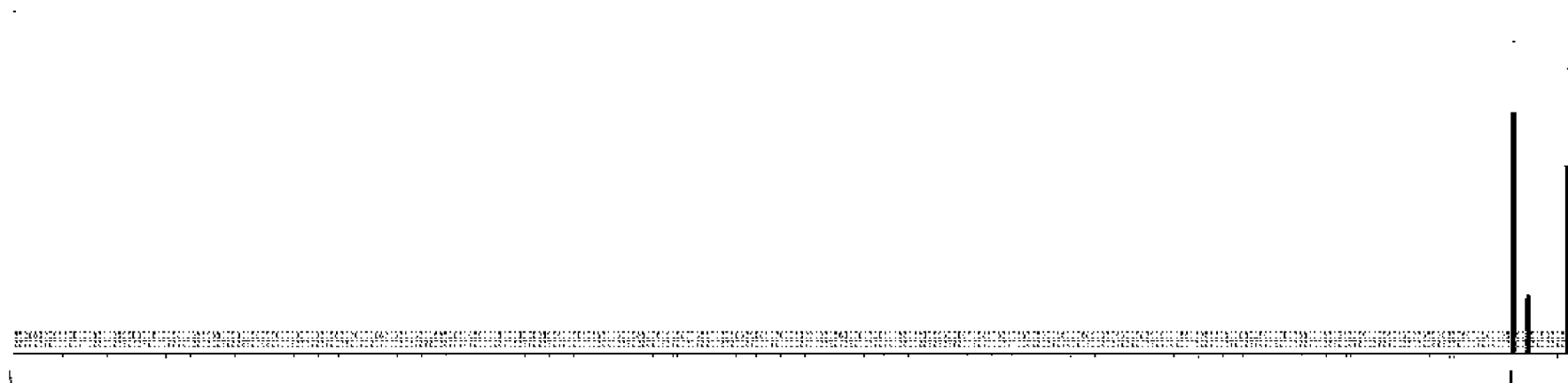
д) факультативно - дополнительно включающий один или более (iii) буферов, (iv) разбавителей, (v) фильтров, (vi) игл или (v) шприцев.

Фигура 1A

Пептид: VLFNIDGQGNHV (A*02:01)

SEQ ID NO: 110

Относительная презентация [условные
единицы]



301 нормальная ткань

3 жировые ткани, 3 надпочечные железы, 16 клеток крови, 15 кровеносных сосудов, 9 костных мозгов, 10 головных мозгов, 7 молочных желез, 6 пищеводов, 2 глаза, 3 желчных пузыря, 6 сердец, 12 почек, 19 толстых кишок, 19 печеней, 45 легких, 7 лимфатических узлов, 8 нервов, 3 яичника, 8 поджелудочных желез, 3 паращитовидные железы, 1 брюшина, 5 гипофизов, 6 плацент, 3 плевры, 3 предстательные железы, 7 слюнных желез, 5 скелетных мышц, 12 образцов кожи, 3 тонкие кишки, 11 селезенки, 5 желудков, 4 семенника, 2 вилочковые железы, 2 щитовидные железы, 9 трахей, 6 мочеточников, 5 маток, 8 мочевых пузырей

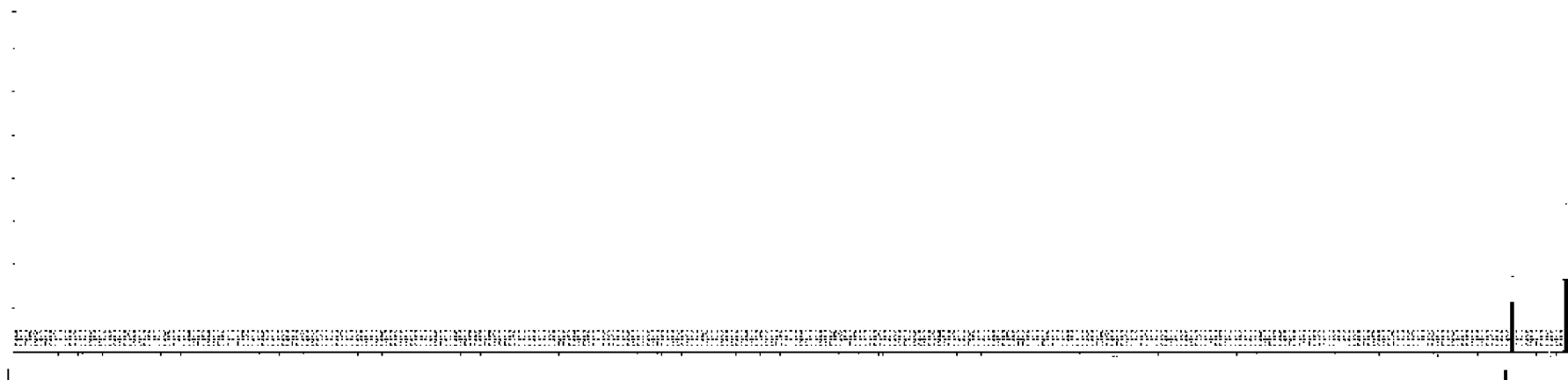
**15 тканей
рака
мочевого
пузыря**

Фигура 1В

Пептид: GLLKAYSIRTA (A*02:01)

SEQ ID NO: 2

Относительная презентация [условные единицы]



301 нормальная ткань

3 жировые ткани, 3 надпочечные железы, 16 клеток крови, 15 кровеносных сосудов, 9 костных мозгов, 10 головных мозгов, 7 молочных желез, 6 пищеводов, 2 глаза, 3 желчных пузыря, 6 сердец, 12 почек, 19 толстых кишок, 19 печеней, 45 легких, 7 лимфатических узлов, 8 нервов, 3 яичника, 8 поджелудочных желез, 3 паращитовидные железы, 1 брюшина, 5 гипофизов, 6 плацент, 3 плевры, 3 предстательные железы, 7 слюнных желез, 5 скелетных мышц, 12 образцов кожи, 3 тонкие кишки, 11 селезенки, 5 желудков, 4 семенника, 2 вилочковые железы, 2 щитовидные железы, 9 трахей, 6 мочеточников, 5 маток, 8 мочевых пузырей

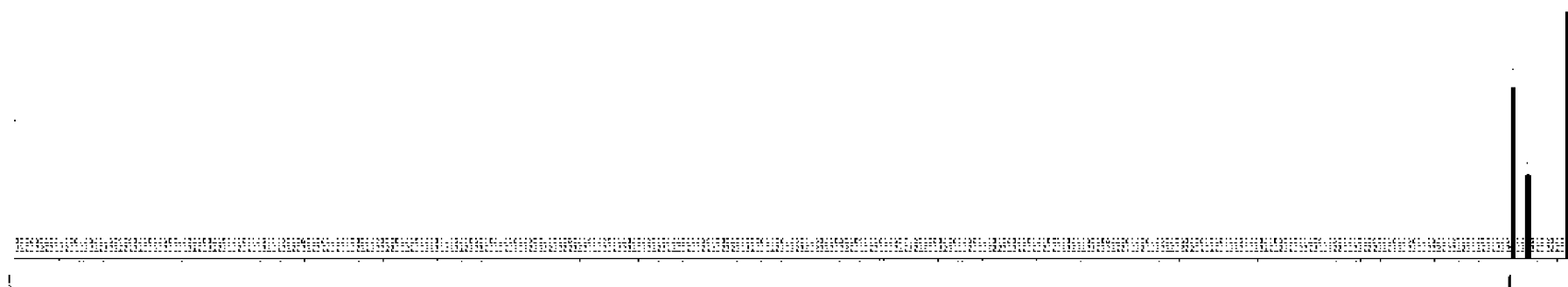
15 тканей
рака
мочевого
пузыря

Фигура 1С

Пептид: YLDPSLNSL (A*02:01)

SEQ ID NO: 112

Относительная презентация [условные
единицы]



301 нормальная ткань

3 жировые ткани, 3 надпочечные железы, 16 клеток крови, 15 кровеносных сосудов, 9 костных мозгов, 10 головных мозгов, 7 молочных желез, 6 пищеводов, 2 глаза, 3 желчных пузыря, 6 сердец, 12 почек, 19 толстых кишок, 19 печеней, 45 легких, 7 лимфатических узлов, 8 нервов, 3 яичника, 8 поджелудочных желез, 3 парашитовидные железы, 1 брюшина, 5 гипофизов, 6 плацент, 3 плевры, 3 предстательные железы, 7 слюнных желез, 5 скелетных мышц, 12 образцов кожи, 3 тонкие кишки, 11 селезенки, 5 желудков, 4 семенника, 2 вилочковые железы, 2 щитовидные железы, 9 трахей, 6 мочеточников, 5 маток, 8 мочевых пузырей

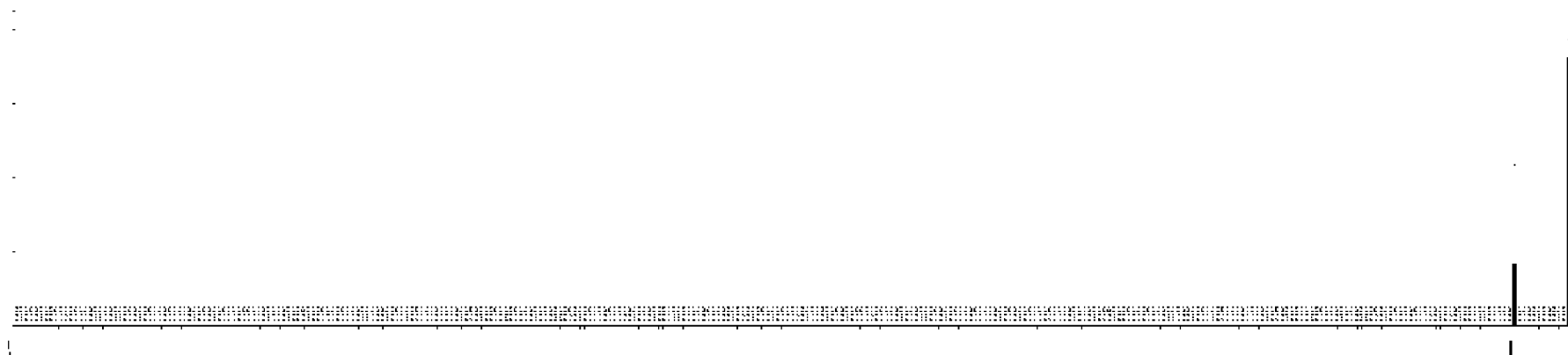
15 тканей
рака
мочевого
пузыря

Фигура 1D

Пептид: FVFERPPGV (A*02:01)

SEQ ID NO: 113

Относительная презентация [условные
единицы]



301 нормальная ткань

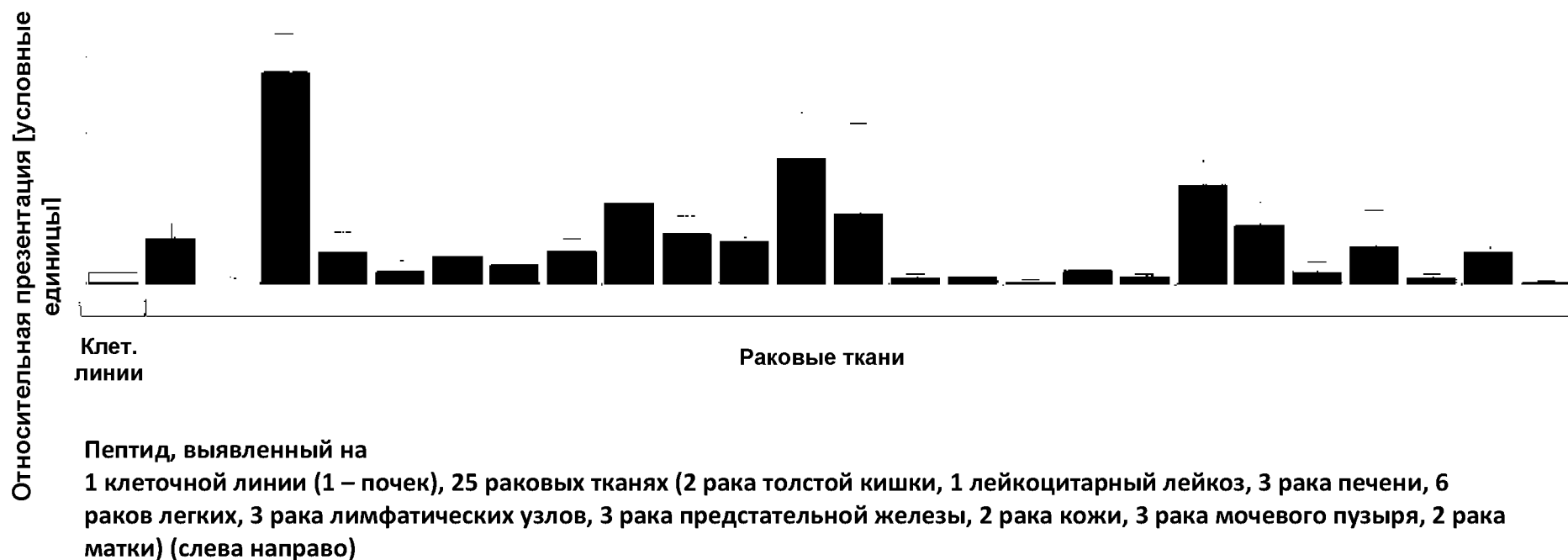
3 жировые ткани, 3 надпочечные железы, 16 клеток крови, 15 кровеносных сосудов, 9 костных мозгов, 10 головных мозгов, 7 молочных желез, 6 пищеводов, 2 глаза, 3 желчных пузыря, 6 сердец, 12 почек, 19 толстых кишок, 19 печеней, 45 легких, 7 лимфатических узлов, 8 нервов, 3 яичника, 8 поджелудочных желез, 3 паращитовидные железы, 1 брюшина, 5 гипофизов, 6 плацент, 3 плевры, 3 предстательные железы, 7 слюнных желез, 5 скелетных мышц, 12 образцов кожи, 3 тонкие кишки, 11 селезенки, 5 желудков, 4 семенника, 2 вилочковые железы, 2 щитовидные железы, 9 трахей, 6 мочеточников, 5 маток, 8 мочевых пузырей

**15 тканей
рака
мочевого
пузыря**

Фигура 1Е

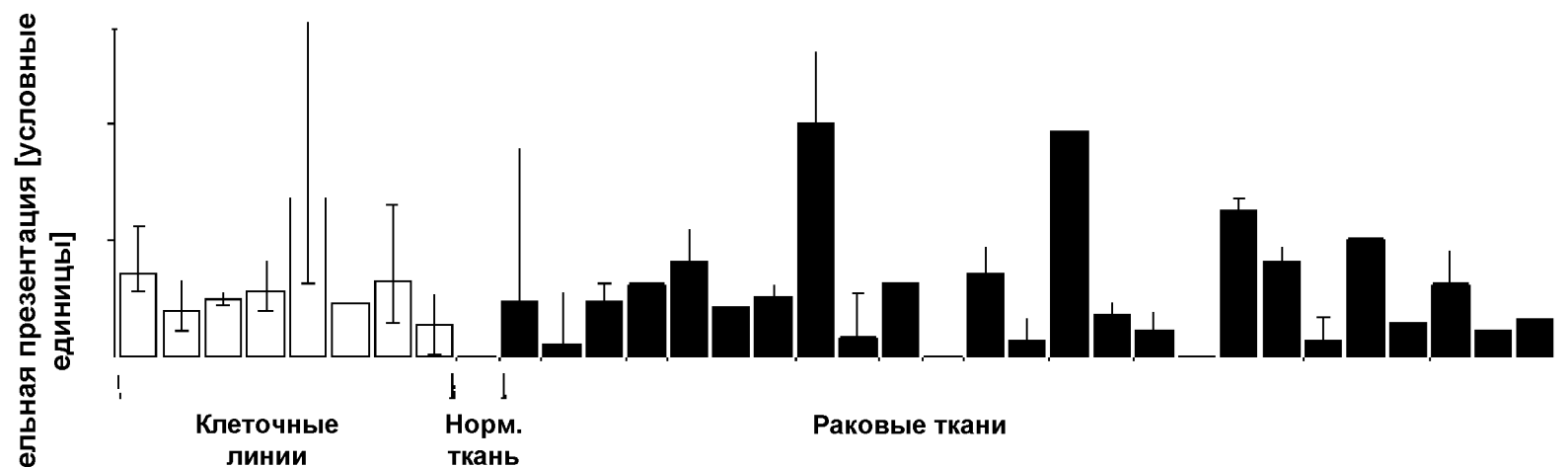
Пептид: Y LAPENGYLMEA (A*02:01)

SEQ ID NO: 15



Фигура 1F

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

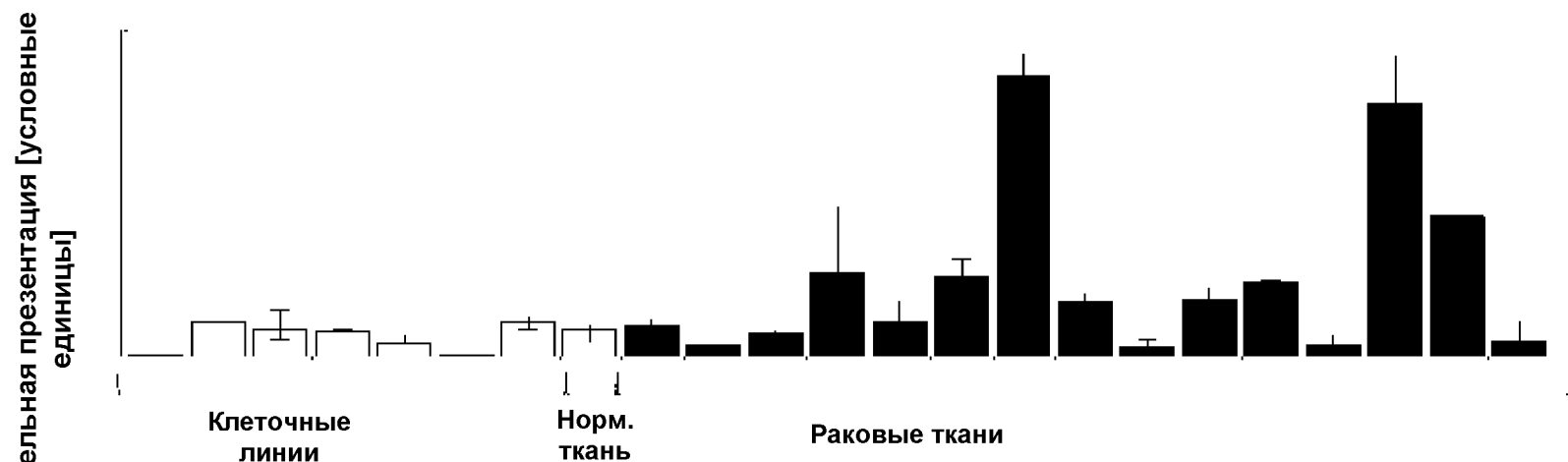


Пептид, выявленный на
8 клеточных линиях (1 – головы и шеи, 1 – яичника, 2 – лимфоцитов, 3 – кожи, 1 – головы и шеи), 1 нормальной ткани (1 селезенка), 25 раковых тканях (1 рак головного мозга, 1 лейкоцитарный лейкоз, 1 рак костного мозга, 1 рак молочной железы, 3 рака толстой кишки, 2 рака печени, 1 рак головы и шеи, 1 рак кожи, 2 рака яичника, 2 рака головного мозга, 7 раков легких, 3 рака мочевого пузыря) (слева направо)

Фигура 1G

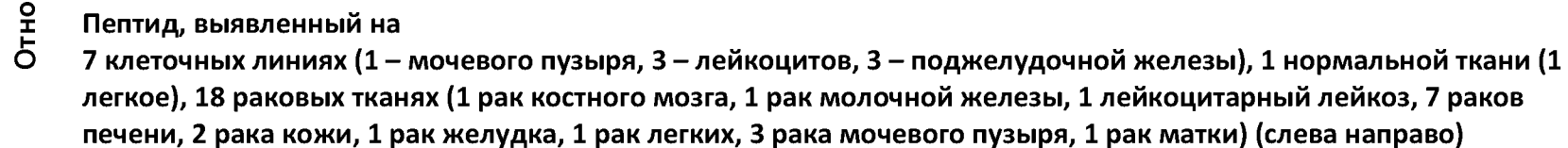
Пептид: RLSQLEGVNV (A*02)

SEQ ID NO: 17

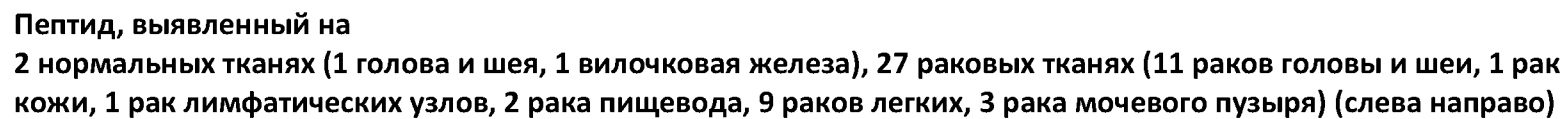


Пептид, выявленный на
7 клеточных линиях (1 – лимфоцитов, 2 – кожи, 4 – поджелудочной железы), 1 нормальной ткани (1 надпочечная железа), 15 раковых тканях (1 рак печени, 2 рака головы и шеи, 2 рака яичника, 1 рак легких, 1 рак почки, 3 рака легких, 4 рака мочевого пузыря, 1 рак матки) (слева направо)

Пептид: GLALLYSGV (A*02)
SEQ ID NO: 26

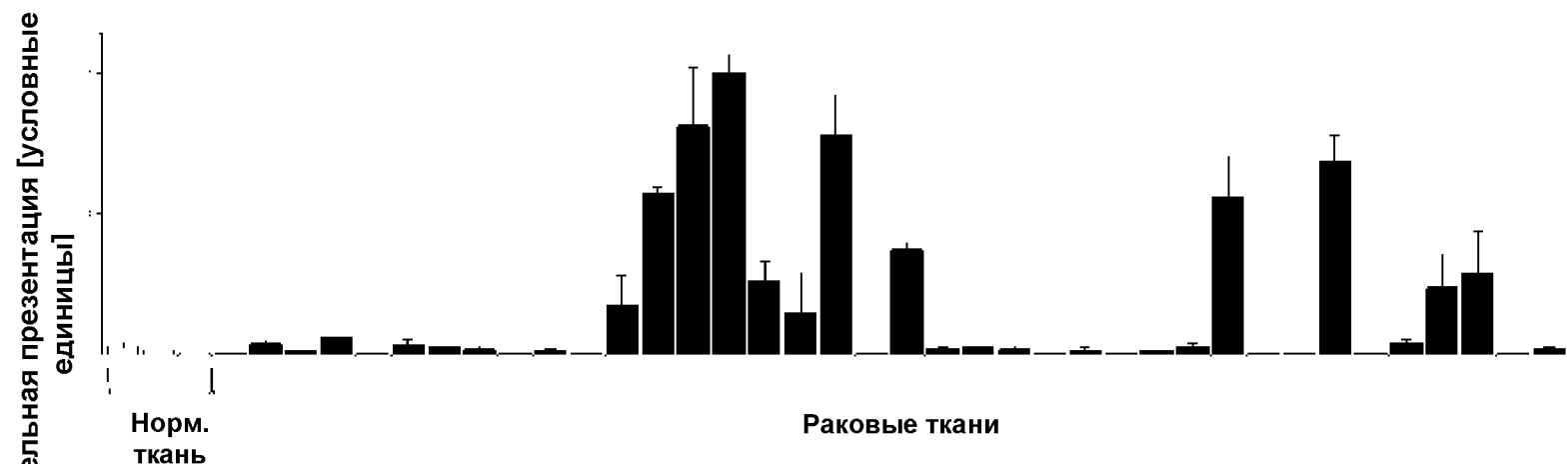


Пептид: GLIDSLMAYV (A*02)
SEQ ID NO: 28



Фигура 1J

Пептид: SLIGGTNFV {A*02}
SEQ ID NO: 49

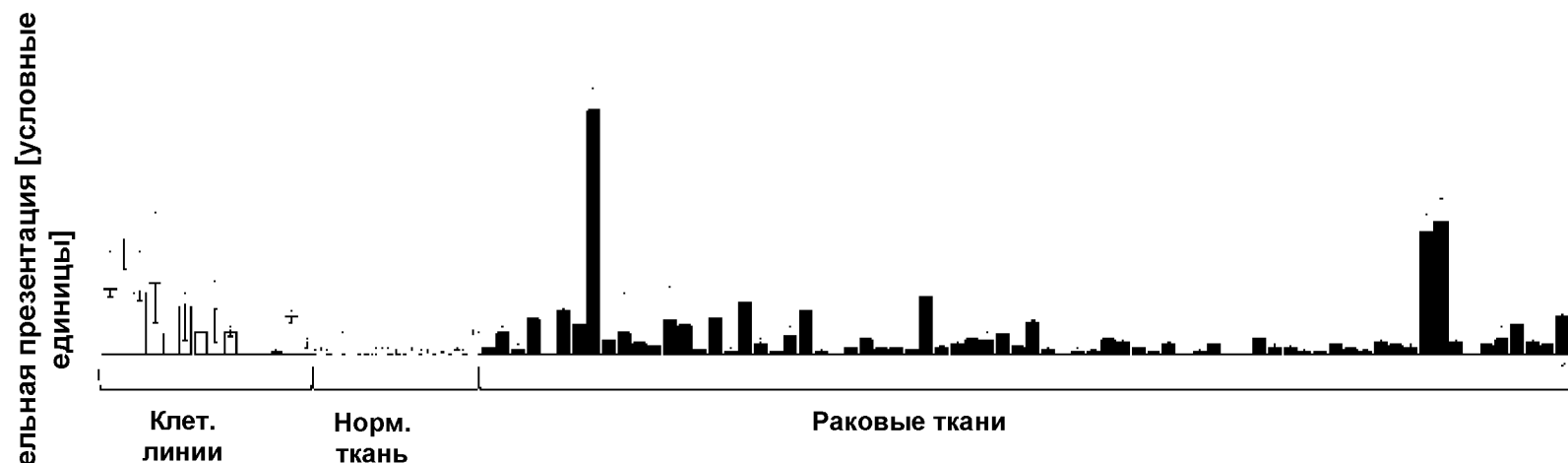


Пептид, выявленный на

3 нормальных тканях (2 лимфатических узлов, 1 селезенки), 38 раковых тканях (1 рак миелоидных клеток, 2 лейкоцитарных лейкоза, 1 рак костного мозга, 1 рак предстательной железы, 3 рака молочной железы, 1 лейкоцитарный лейкоз, 2 рака толстой кишки, 7 раков печени, 2 рака кожи, 8 раков лимфатических узлов, 1 рак пищевода, 4 рака легких, 3 рака мочевого пузыря, 2 рака матки) (слева направо)

Фигура 1К

Пептид: ILLRDLPTL (A*02)
SEQ ID NO: 56



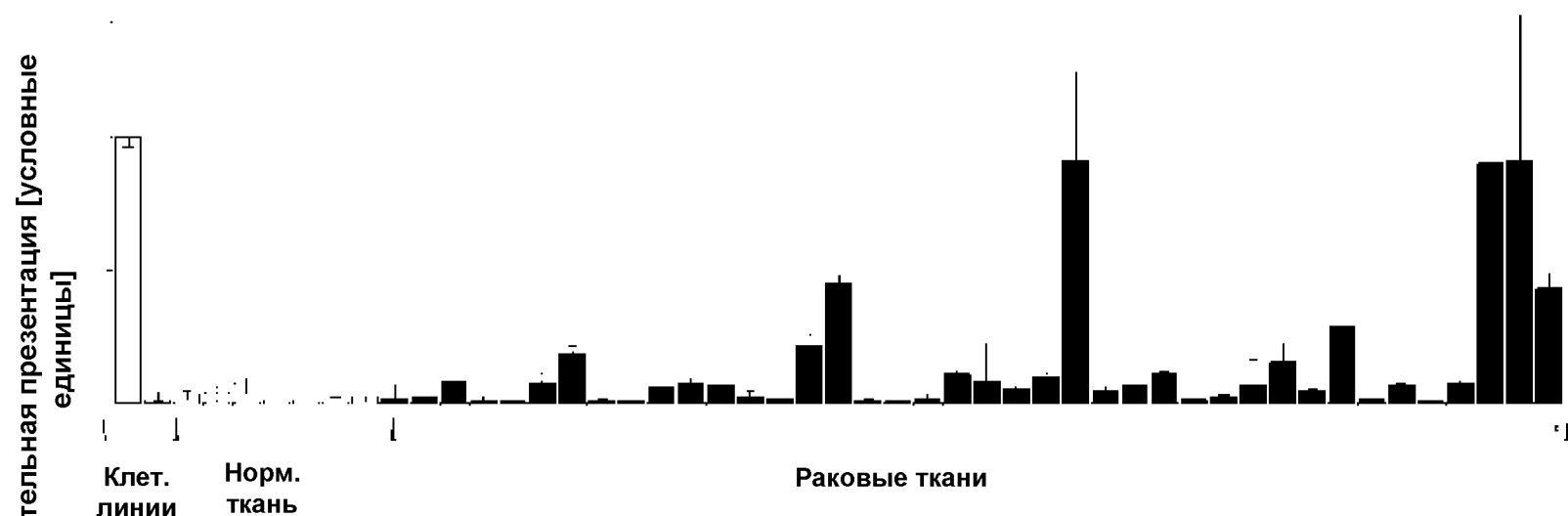
Пептид, выявленный на

14 клеточных линиях (9 – лимфоцитов, 4 – доброкачественных, 1 – поджелудочной железы), 11 нормальных тканях (1 пищевод, 2 печени, 3 легких, 1 паращитовидная железа, 1 селезенка, 1 желудок, 1 щитовидная железа, 1 матка), 72 раковых тканях (17 раков предстательной железы, 4 рака молочной железы, 2 рака толстой кишки, 1 рак желчных протоков, 1 рак желчного пузыря, 1 рак печени, 2 рака головы и шеи, 1 рак кожи, 5 раков лимфатических узлов, 3 рака яичника, 2 рака пищевода, 1 рак пищевода и желудка, 1 рак желудка, 20 раков

Фигура 1L

Пептид: GLDSSVNVQGSVL (A*02)

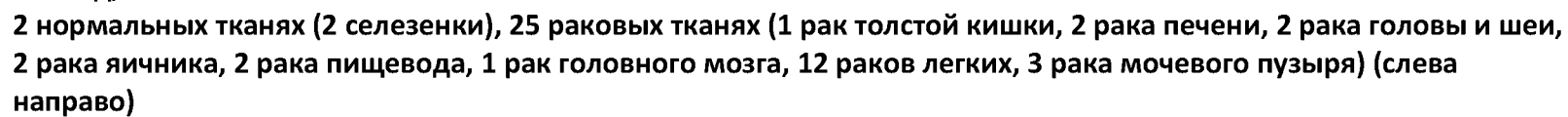
SEQ ID NO: 58



Пептид, выявленный на

2 клеточных линиях (2 – лейкоцитов), 7 нормальных тканях (1 – надпочечника, 1 – лимфатического узла, 5 – селезенки), 40 раковых тканях (1 рак толстой кишки, 1 рак желчных протоков, 1 рак печени, 2 рака головы и шеи, 2 рака кожи, 4 рака лимфатических узлов, 6 раков яичника, 1 рак пищевода и желудка, 1 рак желудка, 17 раков легких, 3 рака мочевого пузыря, 1 рак матки) (слева направо)

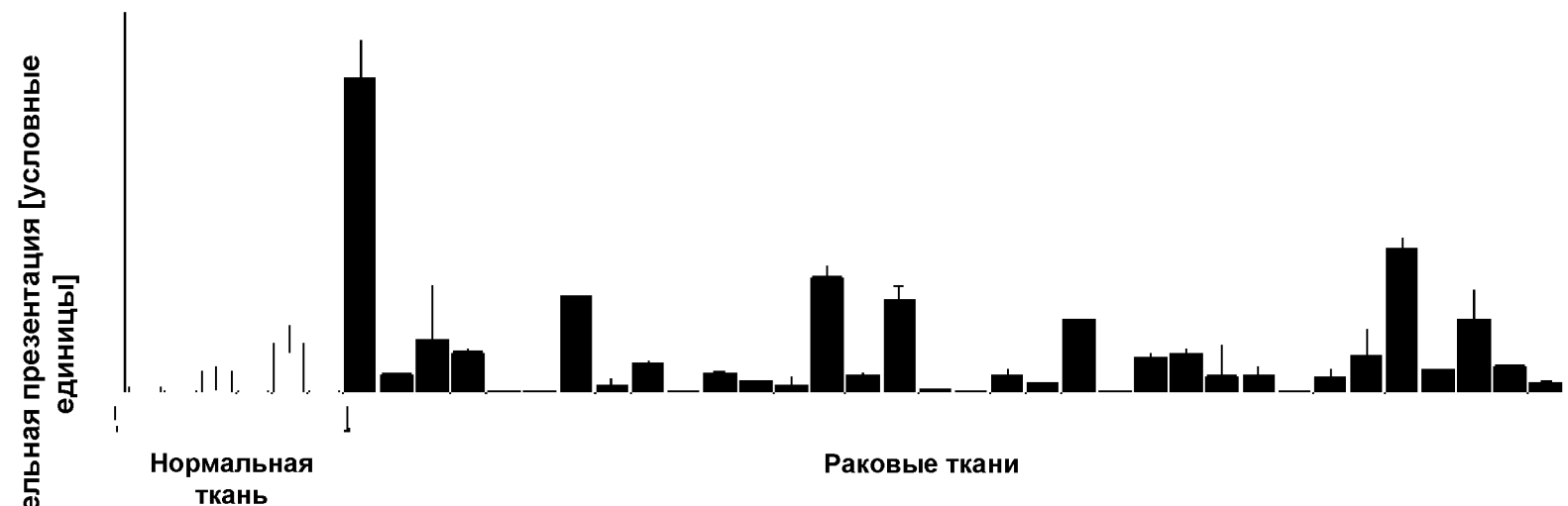
SEQ ID NO: 85



Фигура 1N

Пептид: ALIGDDVGL (A*02)

SEQ ID NO: 99



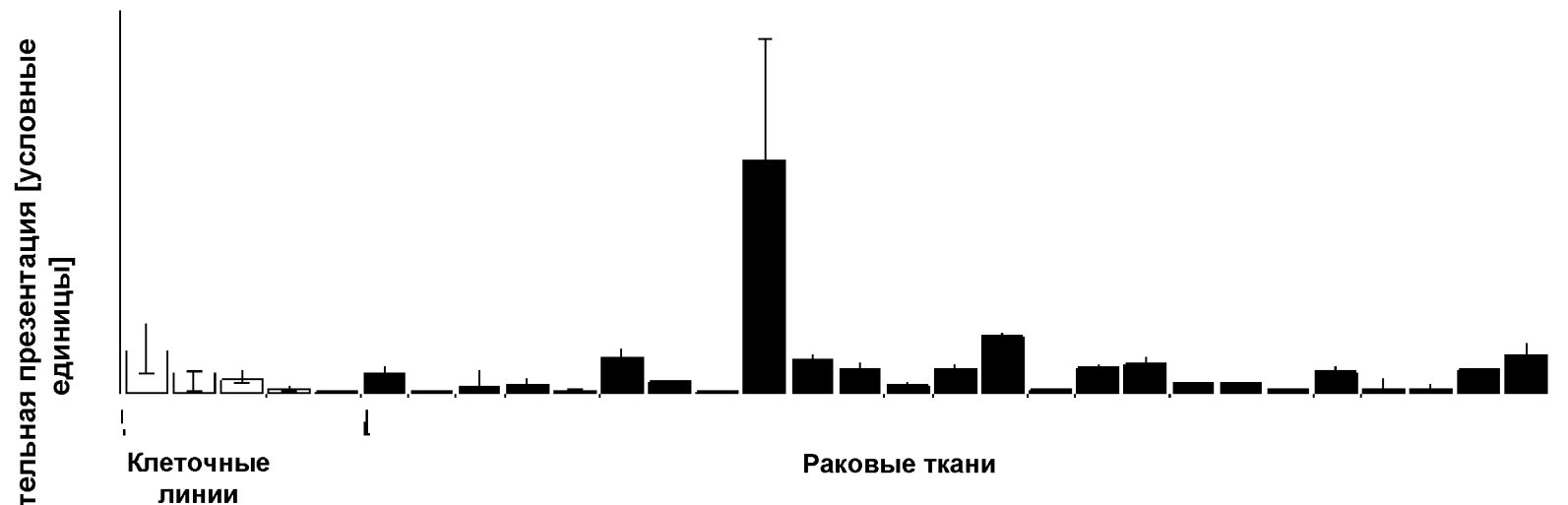
Пептид, выявленный на

6 нормальных тканях (2 образца лейкоцитов, 1 образец лимфоцитов, 1 поджелудочная железа, 1 селезенка, 1 вилочковая железа), 34 раковых тканях (1 рак миелоидных клеток, 1 рак костного мозга, 2 лейкоцитарных лейкоза, 2 рака толстой кишки, 1 колоректальный рак, 1 рак желчного пузыря, 4 рака головы и шеи, 2 рака кожи, 2 рака лимфатических узлов, 2 рака яичника, 1 рак пищевода, 1 рак желудка, 9 раков легких, 4 рака мочевого пузыря, 1 рак матки) (слева направо)

Фигура 10

Пептид: FVFEPPPGV (A*02)

SEQ ID NO: 113



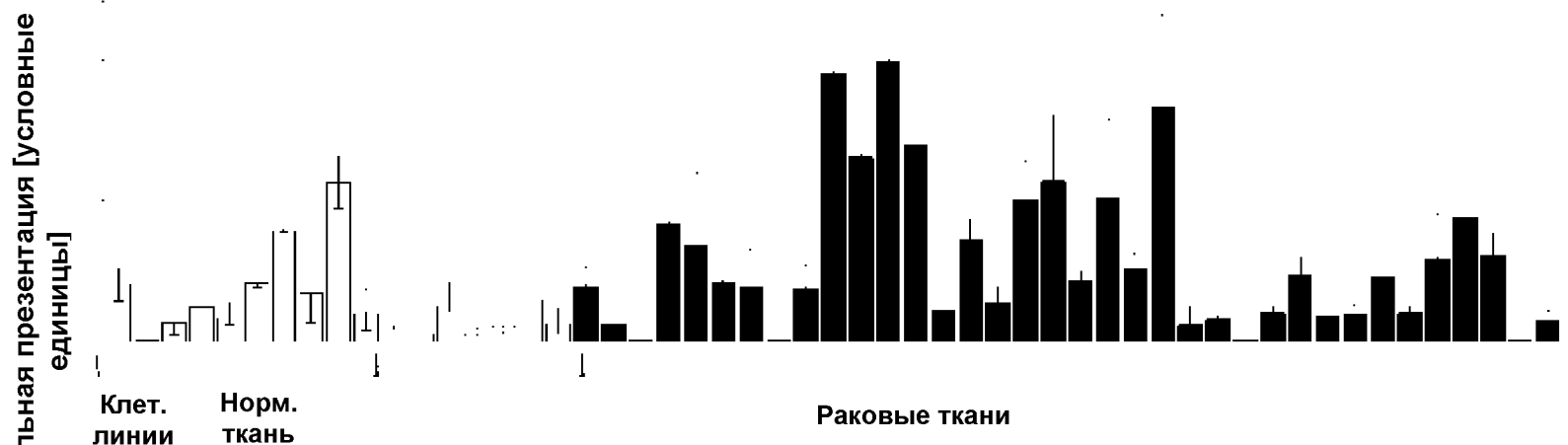
Пептид, выявленный на

5 клеточных линиях (1 – кожи, 1 – мочевого пузыря, 1 – яичника, 2 – поджелудочной железы), 25 раковых тканях (1 рак предстательной железы, 1 рак молочной железы, 1 рак печени, 2 рак головы и шеи, 6 раков кожи, 1 рак лимфатических узлов, 2 рака поджелудочной железы, 1 рак головного мозга, 2 рака желудка, 4 рака легких, 4 рака мочевого пузыря) (слева направо)

Фигура 1Р

Пептид: QLQGYLRSV (A*02)

SEQ ID NO: 121



Пептид, выявленный на

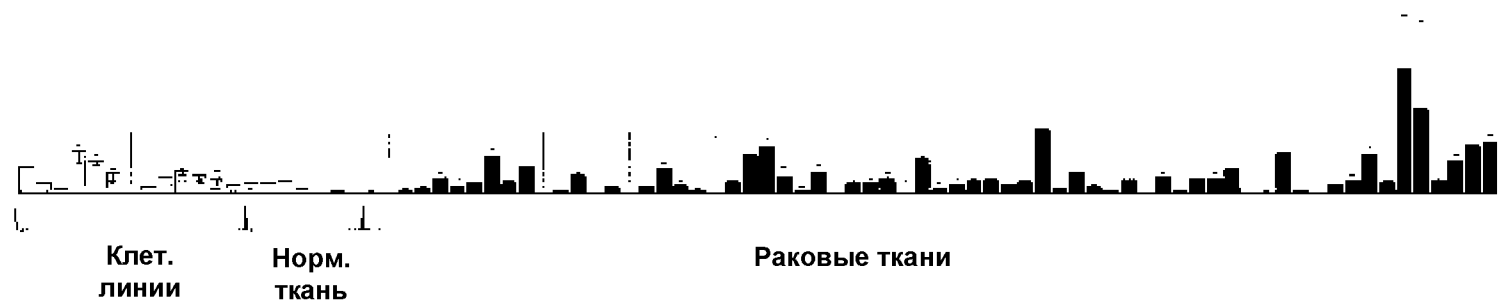
10 клеточных линиях (1 – яичника, 2 – первичных культур, 1 – лимфоцитов, 1 – лейкоцитов, 1 – почки, 2 – прямой кишки, 2 – поджелудочной железы), 7 нормальных тканях (1 надпочечник, 1 образец лейкоцитов, 3 костных мозга, 1 толстая кишка, 1 трахея), 36 раковых тканях (1 рак слепой кишки, 1 рак миелоидных клеток, 1 лейкоцитарный лейкоз, 4 рака толстой кишки, 1 рак прямой кишки, 1 рак желчных протоков, 5 раков печени, 6 раков головы и шеи, 1 рак лимфатических узлов, 1 рак пищевода, 1 рак поджелудочной железы, 1 рак головного мозга, 9 раков легких, 1 рак мочевого пузыря, 2 рака матки) (слева направо)

Фигура 1Q

Пептид: ILEPSLYTV (A*02)

SEQ ID NO: 122

Относительная презентация [условные единицы]



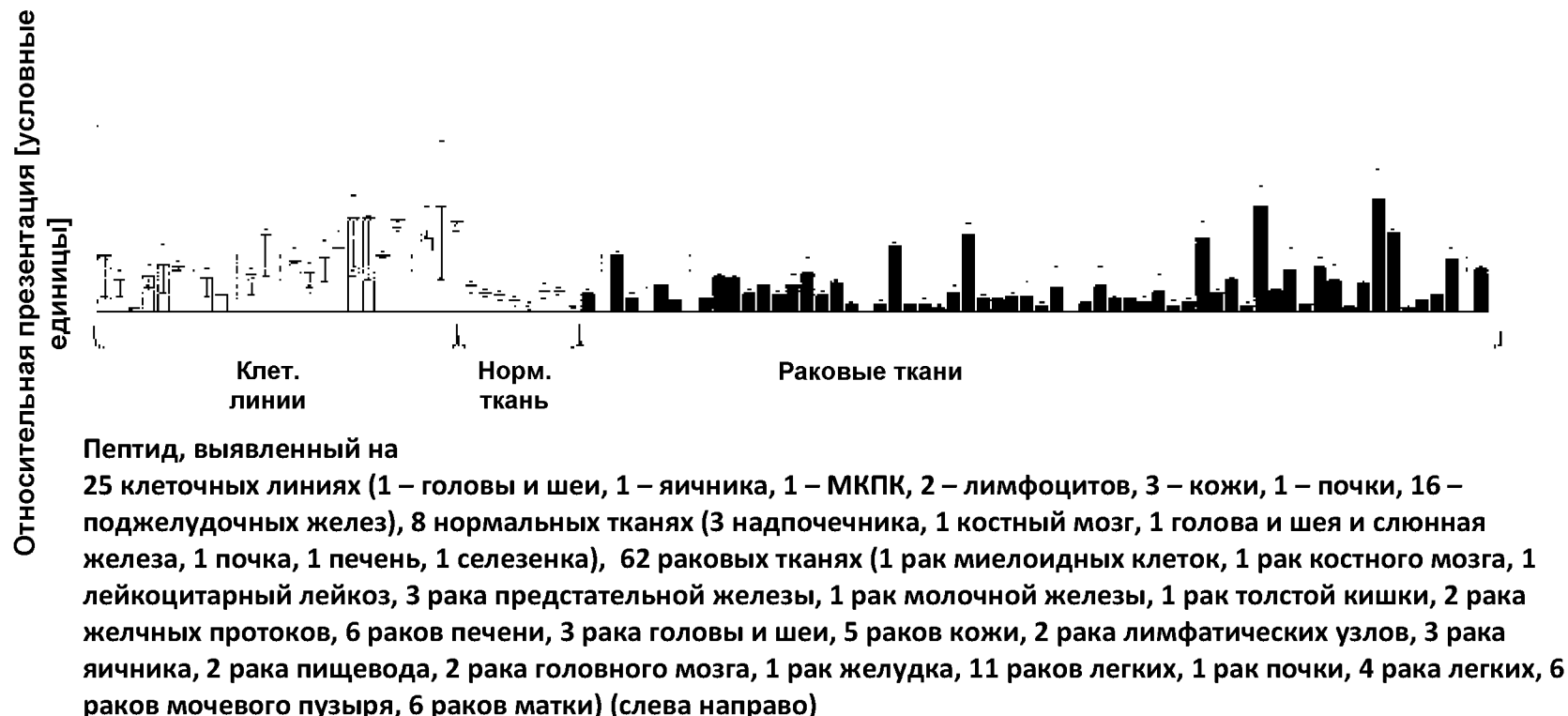
Пептид, выявленный на

13 клеточных линиях (1 – почки, 2 – лейкоцитов, 1 – кожи, 9 – поджелудочных желез), 10 нормальных тканях (1 надпочечник, 5 толстых кишок, 1 печень, 2 легких, 1 лимфатический узел), 63 раковых тканях (2 рака миелоидных клеток, 2 лейкоцитарных лейкоза, 1 рак костного мозга, 2 рак предстательной железы, 4 рака молочной железы, 2 лейкоцитарных лейкоза, 1 рак толстой кишки, 1 рак прямой кишки, 1 рак желчных протоков, 7 раков печени, 3 рака головы и шеи, 5 раков кожи, 2 рака лимфатических узлов, 2 рака яичника, 1 рак пищевода, 1 рак поджелудочной железы, 5 раков головного мозга, 4 рака желудка, 5 раков легких, 3 рака почки, 1 рак легких, 4 рака мочевого пузыря, 4 рака матки) (слева направо)

Фигура 1R

Пептид: YLEPKLTQV (A*02)

SEQ ID NO: 129



Фигура 2А

Ген: TMPRSS4

Пептид: ILLQASVQV

SEQ ID NO: 1



Фигура 2В

Ген: KRT7

Пептид: ALSFSSSAGPGLLKA

SEQ ID NO: 8



Фигура 2С

Ген: CYP4F22

Пептид: AMAELRVVV

SEQ ID NO: 11

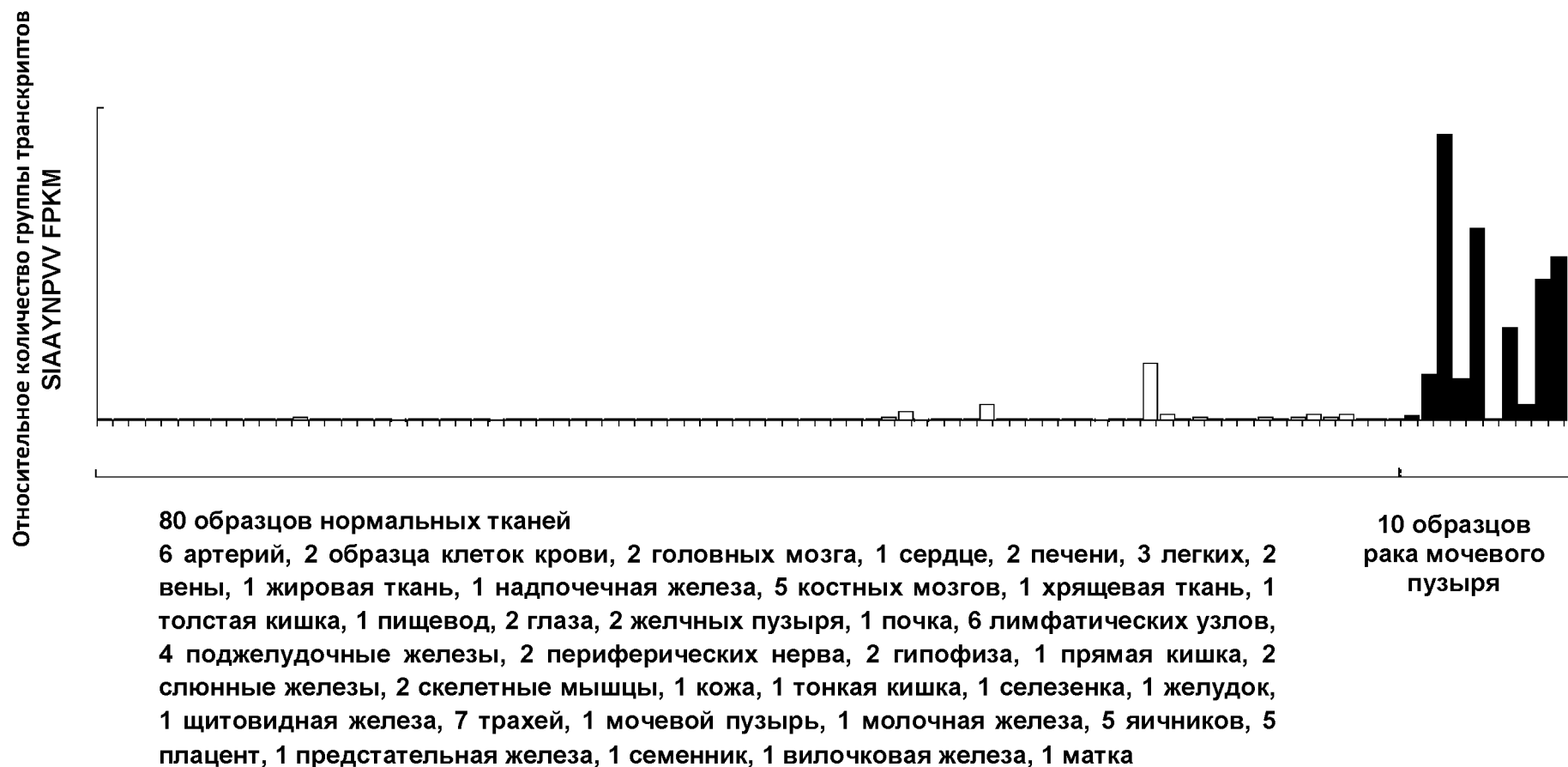


Фигура 2D

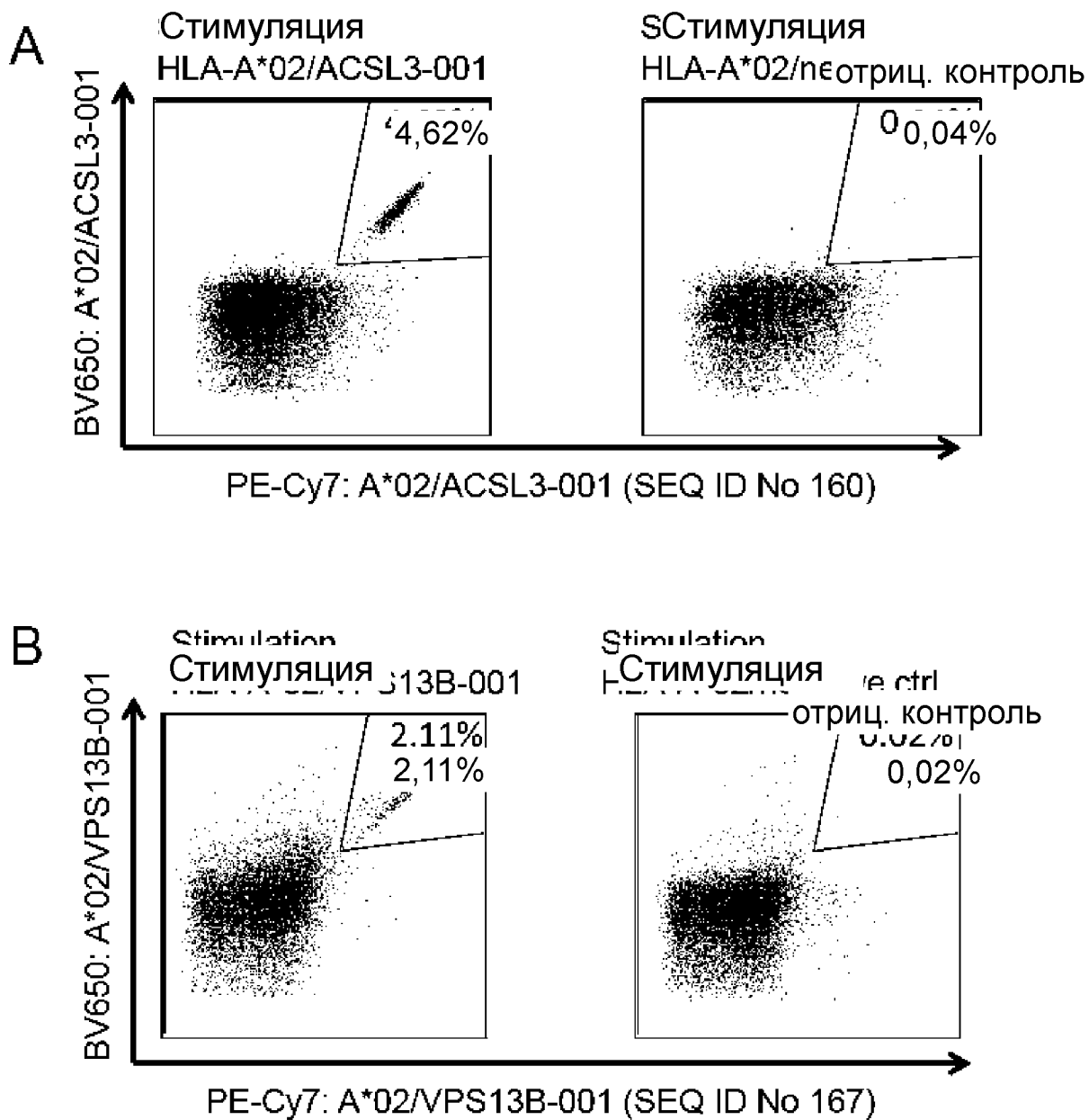
Ген: DHRS2

Пептид: SIAAYNPVV

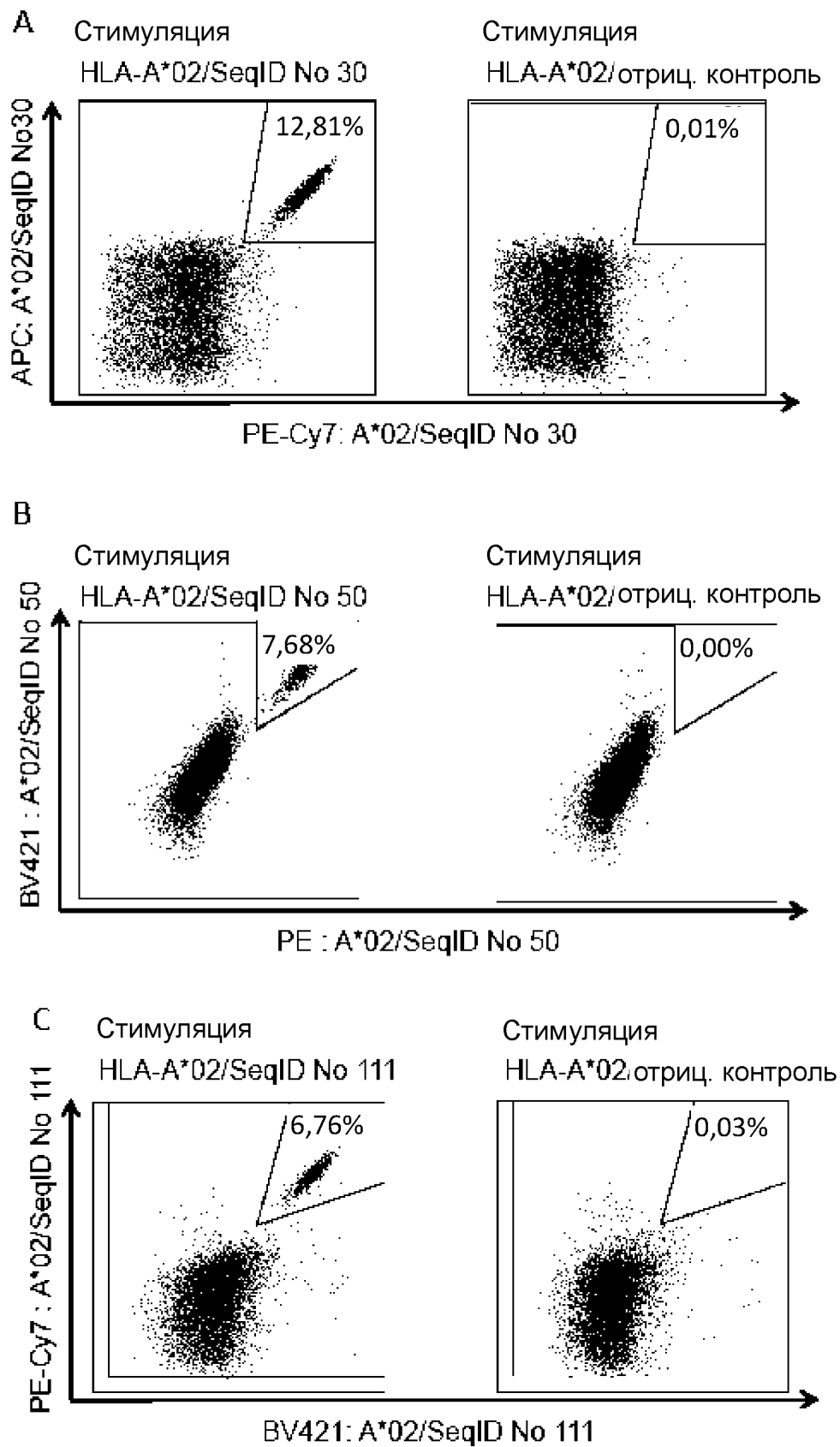
SEQ ID NO: 18



Фигура 3



Фигура 4



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference I32944WO	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2017/054559	International filing date (<i>day/month/year</i>) 28 February 2017 (28-02-2017)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 1 March 2016 (01-03-2016)
Applicant IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH		

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

This international search report consists of a total of 9 sheets.

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

1. Basis of the report

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

☒

the international application in the language in which it was filed

☐

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

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

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

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

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

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

☒

the text is approved as submitted by the applicant

☐

the text has been established by this Authority to read as follows:

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

☒

the text is approved as submitted by the applicant

☐

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

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

a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____

☐

as suggested by the applicant

☐

as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure

☐

as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2017/054559

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2017/054559

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-23(partially)

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/054559

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/00 C07K14/47 C07K7/06
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	S. JARMALAVICIUS ET AL: "High Immunogenicity of the Human Leukocyte Antigen Peptidomes of Melanoma Tumor Cells", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 287, no. 40, 28 September 2012 (2012-09-28), pages 33401-33411, XP055218706, US ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M112.358903 the whole document ----- -/--	1-23



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 July 2017

Date of mailing of the international search report

14/07/2017

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Pinheiro Vieira, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/054559

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MICHAL BASSANI-STERBERG ET AL: "Mass Spectrometry of Human Leukocyte Antigen Class I Peptidomes Reveals Strong Effects of Protein Abundance and Turnover on Antigen Presentation", MOLECULAR & CELLULAR PROTEOMICS, vol. 14, no. 3, 2 March 2015 (2015-03-02), pages 658-673, XP055272560, US ISSN: 1535-9476, DOI: 10.1074/mcp.M114.042812 the whole document -----	1-23
Y	EP 1 760 088 A1 (IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH [DE]) 7 March 2007 (2007-03-07) the whole document -----	1-23
Y	WO 2011/113819 A2 (IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH [DE]; WEINSCHENK TONI [DE]; FRITSCH JEN) 22 September 2011 (2011-09-22) table 2; sequence 60 -----	1-23
X	WO 2007/139260 A1 (KOREA RES INST OF BIOSCIENCE [KR]; PARK YOUNG WOO [KR]; KIM SEMI [KR];) 6 December 2007 (2007-12-06) claim 21 -----	1-3,5,6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/054559

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1760088	A1	07-03-2007	AT 388164 T 15-03-2008
			AT 451388 T 15-12-2009
			AT 461214 T 15-04-2010
			AT 461215 T 15-04-2010
			AT 532795 T 15-11-2011
			AU 2006289290 A1 15-03-2007
			AU 2010236029 A1 18-11-2010
			BR PI0615462 A2 17-05-2011
			CA 2621389 A1 15-03-2007
			CA 2929252 A1 15-03-2007
			CN 101287754 A 15-10-2008
			CN 103059104 A 24-04-2013
			CN 105440119 A 30-03-2016
			CY 1107973 T1 04-09-2013
			CY 1109849 T1 10-09-2014
			CY 1110051 T1 14-01-2015
			CY 1110187 T1 14-01-2015
			CY 1112186 T1 09-12-2015
			DE 602005005196 T2 26-06-2008
			DK 1760088 T3 09-06-2008
			DK 1806358 T3 28-06-2010
			DK 1806359 T3 14-06-2010
			DK 1922335 T3 19-04-2010
			DK 2135878 T3 27-02-2012
			EA 200800677 A1 29-08-2008
			EP 1760088 A1 07-03-2007
			EP 1806358 A2 11-07-2007
			EP 1806359 A1 11-07-2007
			EP 1922335 A2 21-05-2008
			EP 2135878 A1 23-12-2009
			EP 2138509 A1 30-12-2009
			ES 2302546 T3 16-07-2008
			ES 2337399 T3 23-04-2010
			ES 2341295 T3 17-06-2010
			ES 2341802 T3 28-06-2010
			ES 2373907 T3 10-02-2012
			HK 1183678 A1 06-05-2016
			HK 1220709 A1 12-05-2017
			HR P20100128 T1 30-04-2010
			HR P20110981 T1 29-02-2012
			JP 5627180 B2 19-11-2014
			JP 2010502173 A 28-01-2010
			KR 20080052643 A 11-06-2008
			KR 20130019033 A 25-02-2013
			KR 20130019034 A 25-02-2013
			NZ 566104 A 29-04-2011
			NZ 588813 A 30-06-2011
			PT 1760088 E 14-05-2008
			PT 1806358 E 28-05-2010
			PT 1806359 E 25-05-2010
			PT 1922335 E 03-03-2010
			PT 2135878 E 05-01-2012
			SI 1760088 T1 30-06-2008
			SI 1806358 T1 30-06-2010
			SI 1806359 T1 30-06-2010
			SI 1922335 T1 30-04-2010
			SI 2135878 T1 30-03-2012
			UA 98295 C2 10-05-2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/054559

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2008206216 A1	28-08-2008
		US 2008206217 A1	28-08-2008
		US 2008206218 A1	28-08-2008
		US 2008207520 A1	28-08-2008
		US 2010040590 A1	18-02-2010
		US 2016115212 A1	28-04-2016
		WO 2007028574 A2	15-03-2007

WO 2011113819	A2	22-09-2011	
		AU 2011229199 A1	16-08-2012
		CA 2789857 A1	22-09-2011
		CA 2936642 A1	22-09-2011
		CN 102905721 A	30-01-2013
		CN 105001339 A	28-10-2015
		DK 2547354 T3	20-07-2015
		DK 2845604 T3	01-05-2017
		EA 201201306 A1	28-02-2013
		EA 201690511 A1	30-11-2016
		EP 2547354 A2	23-01-2013
		EP 2845604 A2	11-03-2015
		EP 2923708 A1	30-09-2015
		EP 3058947 A2	24-08-2016
		EP 3195873 A1	26-07-2017
		ES 2544529 T3	01-09-2015
		HK 1180610 A1	23-10-2015
		HK 1208174 A1	26-02-2016
		HK 1210586 A1	29-04-2016
		HR P20150867 T1	25-09-2015
		HU E027036 T2	29-08-2016
		JP 5891181 B2	22-03-2016
		JP 2013521789 A	13-06-2013
		JP 2016034950 A	17-03-2016
		JP 2017006136 A	12-01-2017
		KR 20130016304 A	14-02-2013
		KR 20160106192 A	09-09-2016
		LT 2845604 T	25-04-2017
		NZ 601438 A	24-12-2014
		NZ 627877 A	28-08-2015
		NZ 708205 A	25-09-2015
		NZ 711296 A	31-03-2017
		PH 12016500949 A1	13-02-2017
		PT 2547354 E	16-09-2015
		SG 183880 A1	30-10-2012
		SG 10201502093Q A	28-05-2015
		SG 10201606771S A	28-10-2016
		SI 2547354 T1	30-09-2015
		SI 2845604 T1	30-06-2017
		TW 201200594 A	01-01-2012
		TW 201529849 A	01-08-2015
		UA 111711 C2	10-06-2016
		US 2011229504 A1	22-09-2011
		US 2013045191 A1	21-02-2013
		US 2015147347 A1	28-05-2015
		WO 2011113819 A2	22-09-2011

WO 2007139260	A1	06-12-2007	
		EP 2037939 A1	25-03-2009
		KR 20070114970 A	05-12-2007
		US 2011318361 A1	29-12-2011
		WO 2007139260 A1	06-12-2007

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/054559

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-23(partially)

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

2-149. claims: 1-23(partially)

A peptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID No. 2 to SEQ ID No. 149, and variant sequences thereof which are at least 88% homologous to SEQ ID No. 2 to SEQ ID No. 149, and wherein said variant binds to molecule(s) of the major histocompatibility complex (MHC) and/or induces T cells cross-reacting with said variant peptide; and a pharmaceutical acceptable salt thereof, wherein said peptide is not a full-length polypeptide.

150. claims: 24-32

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