

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202190357** (13) **A2**

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

**(43)** Дата публикации заявки  
**2021.06.30**

**(51)** Int. Cl. **C07K 7/06** (2006.01)  
**C07K 7/08** (2006.01)  
**A61K 38/04** (2006.01)

**(22)** Дата подачи заявки  
**2016.12.05**

---

**(54) НОВЫЕ ПЕПТИДЫ И КОМБИНАЦИИ ПЕПТИДОВ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В  
ИММУНОТЕРАПИИ НЕСКОЛЬКИХ ВИДОВ РАКА**

---

**(31)** 1521894.4; 62/266,233

**(32)** 2015.12.11

**(33)** GB; US

**(62)** 201891116; 2016.12.05

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

**(72)** Изобретатель:

**Махр Андреа, Вайншенк Тони, Сонг  
Колетт, Шур Оливер, Фритше Дженс  
(DE), Сингх Харприт (US)**

**(74)** Представитель:

**Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М.,  
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,  
Парамонова К.В., Костюшенкова  
М.Ю. (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 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.

**202190357**

**A2**

**A2**

**202190357**

## **НОВЫЕ ПЕПТИДЫ И КОМБИНАЦИИ ПЕПТИДОВ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ИММУНОТЕРАПИИ НЕСКОЛЬКИХ 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 опухолиассоциированным пептидным эпитопам Т-клеток, в отдельности или в комбинации с другими опухолиассоциированными пептидами, которые могут, например, служить в качестве активных фармацевтических ингредиентов вакцинных композиций, стимулирующих противоопухолевые иммунные ответы, или стимулировать Т-клетки *ex vivo* с их перенесением в организм пациента. Пептиды, связанные с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС), или пептиды в отдельности могут быть также мишенями антител, растворимых Т-клеточных рецепторов и других связывающих молекул.

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

### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в 2012 г. рак находился среди четырех основных неинфекционных смертельно опасных заболеваний в мире. По данным за тот же год колоректальный рак, рак молочной железы и раковые заболевания дыхательных путей находились в списке 10 наиболее распространенных причин смерти в странах с высоким уровнем доходов (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>).

### Эпидемиология

Согласно оценкам, на 2012 г. приходится 14,1 миллиона новых случаев заболевания раком, 32,6 миллиона пациентов, страдающих раковыми заболеваниями (в течение 5 лет после постановки диагноза), и 8,2 миллиона случаев летального исхода от рака в мире (Ferlay et al., 2013; Bray et al., 2013). В Таблице 1 и Таблице 2 дается обзор предполагаемой частоты заболеваемости, распространенности заболевания за 5 лет и уровня смертности при различных видах рака, имеющих значение для настоящего изобретения во всем мире и в выбранных регионах, соответственно.

Таблица 1: Приблизительная частота заболеваемости, распространенность заболевания за 5 лет и уровень смертности от различных видов рака (взрослая популяция, оба пола) во всем мире в 2012 г. (Ferlay et al., 2013; Bray et al., 2013).

| <b>Вид рака</b>                   | <b>Частота<br/>заболеваемости</b> | <b>Распространенность<br/>(за 5 лет)</b> | <b>Смертность</b> |
|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------|-------------------|
| Головной мозг,<br>нервная система | 256213                            | 342914                                   | 189382            |
| Молочная железа                   | 1671149                           | 6232108                                  | 521907            |
| Толстая и прямая<br>кишка         | 1360602                           | 3543582                                  | 693933            |
| Пищевод                           | 455784                            | 464063                                   | 400169            |
| Почки                             | 337860                            | 906746                                   | 143406            |
| Лейкоз                            | 351965                            | 500934                                   | 265471            |
| Печень                            | 782451                            | 633170                                   | 745533            |
| Легкие                            | 1824701                           | 1893078                                  | 1589925           |
| Меланома                          | 232130                            | 869754                                   | 55488             |
| Яичник                            | 238719                            | 586624                                   | 151917            |
| Поджелудочная<br>железа           | 337872                            | 211544                                   | 330391            |
| Предстательная<br>железа          | 1094916                           | 3857500                                  | 307481            |
| Желудок                           | 951594                            | 1538127                                  | 723073            |
| Желчный пузырь                    | 178101                            | 205646                                   | 142823            |
| Мочевой пузырь                    | 429793                            | 1319749                                  | 165084            |
| Тело матки                        | 319605                            | 1216504                                  | 76160             |
| Неходжкинская<br>лимфома (НХЛ)    | 385741                            | 832843                                   | 199670            |

Таблица 2: Приблизительная частота заболеваемости, распространенность заболевания за 5 лет и уровень смертности от различных видов рака (взрослая

популяция, оба пола) в США, ЕС-28, Китае и Японии в 2012 г. (Ferlay et al., 2013; Bray et al., 2013).

| Вид рака                       | Частота заболеваемости | Распространенность (за 5 лет) | Смертность |
|--------------------------------|------------------------|-------------------------------|------------|
| Головной мозг, нервная система | 135884                 | 172497                        | 100865     |
| Молочная железа                | 837245                 | 3358034                       | 197279     |
| Толстая и прямая кишка         | 845797                 | 2334303                       | 396066     |
| Пищевод                        | 294734                 | 323723                        | 255752     |
| Почки                          | 226733                 | 631350                        | 83741      |
| Лейкоз                         | 178296                 | 309154                        | 129500     |
| Печень                         | 513172                 | 441007                        | 488485     |
| Легкие                         | 1274568                | 1394735                       | 1107546    |
| Меланома                       | 163043                 | 636364                        | 32999      |
| Яичник                         | 108947                 | 270204                        | 65130      |
| Поджелудочная железа           | 220842                 | 134864                        | 214886     |
| Предстательная железа          | 681069                 | 2586710                       | 136419     |
| Желудок                        | 615641                 | 1076332                       | 447735     |
| Желчный пузырь                 | 106202                 | 118588                        | 81391      |
| Мочевой пузырь                 | 270335                 | 879140                        | 91553      |
| Тело матки                     | 199211                 | 765101                        | 41734      |
| Неходжкинская лимфома (НХЛ)    | 205955                 | 515154                        | 90092      |

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

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

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

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

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

## Терапия

### *Рак молочной железы*

Рак молочной железы является иммуногенным видом рака, и различные виды инфильтрующих иммунных клеток в первичных опухолях обладают определенной прогностической и предсказывающей значимостью. Было проведено множество

клинических исследований ранних фаз в области иммунотерапии для пациентов с раком молочной железы. Целями большинства завершенных вакцинационных исследований были HER2 и углеводные антигены, как MUC-1, и их результаты неутешительны. Сейчас появляются клинические данные о воздействии модуляции иммунных контрольных точек с помощью ипилимумаба и других активирующих Т-клетки антител на пациентов с раком молочной железы (Emens, 2012).

### *Хронический лимфоцитарный лейкоз*

В то время как ХЛЛ в настоящее время не поддается лечению, у многих пациентов наблюдаются лишь медленное прогрессирование заболевания или усиление симптомов. Поскольку пациенты не получают пользу от раннего начала лечения, первоначальный подход основан на принципе «наблюдай и жди» (Richards et al., 1999). Для пациентов с клиническими симптомами или быстро прогрессирующим заболеванием имеется несколько видов лечения. Они включают химиотерапию, таргетную терапию, терапию иммунными препаратами, как, например, моноклональные антитела, химерные антигенные рецепторы (CAR), и активную иммунотерапию, а также трансплантацию стволовых клеток.

Моноклональные антитела широко используются при лечении гематологических злокачественных заболеваний. Это связано с тем, что на основании хорошо охарактеризованных поверхностных молекул иммунных клеток и доступности опухолевых клеток в крови или костном мозге известны подходящие антигены. Мишенями широко используемых в лечении ХЛЛ моноклональных антител являются CD20 или CD52. Ритуксимаб, первое моноклональное антитело к CD20, первоначально одобренное FDA для лечения НХЛ, сейчас широко используется в терапии ХЛЛ. Лечение комбинацией препаратов ритуксимаб/флударабин/циклофосфамид ведет к увеличению доли полных ответов (CR) и улучшало общую выживаемость (OS) по сравнению с комбинацией препаратов флударабин/циклофосфамид и стало предпочтительным вариантом лечения (Hallek et al., 2008). Мишенью офатумомаба является CD20, и он применяется в лечении пациентов с рефрактерным ХЛЛ (Wierda et al., 2011). Другим

моноклональным антителом к CD20 является обинутузумаб, применяемый в терапии первой линии в комбинации с хлорамбуцилом (Goede et al., 2014).

Алемтузумаб – это антитело к CD52, применяемое для лечения пациентов с заболеваниями, резистентными к химиотерапии, или пациентов с неблагоприятными прогностическими факторами, такими как del(17p) или мутации p53 (Parikh et al., 2011). Мишенями новых препаратов на основе моноклональных антител, проходящих сейчас доклинические испытания, являются CD37 (отлертузумаб, BI 836826, IMGN529 и (177)Лу-тетуломаб) или CD40 (дацетузумаб и лукатумумаб) (Robak and Robak, 2014).

Несколько завершенных и проводимых сейчас клинических исследований основаны на применении полученных методом генной инженерии аутологичных Т-клетках, измененных с помощью химерных антигенных рецепторов (CAR), со специфичностью к CD19 (Maus et al., 2014). До сих пор лишь у малой части пациентов были выявлены поддающиеся обнаружению или стабильно присутствующие рецепторы CAR. Один частичный ответ (PR) и два полных ответа (CR) были обнаружены в исследованиях Т-клеток CAR, проведенных Porter и соавт. и Kalos и соавт. (Kalos et al., 2011; Porter et al., 2011).

Активная иммунотерапия включает следующие стратегии: генная терапия, вакцины на основе цельных модифицированных опухолевых клеток, вакцины на основе ДК и пептидов, полученных из опухолеассоциированных антигенов (ТАА).

В подходах генной терапии используются аутологичные генетически измененные опухолевые клетки. Такие клетки В-клеточного ХЛЛ трансфицируют иммуно-(ко-)стимулирующими генами, такими как ИЛ-2, ИЛ-12, TNF-альфа, ГМ-КСФ, CD80, CD40L, LFA-3 и ICAM-1, чтобы улучшить презентацию антигена и активацию Т-клеток (Carballido et al., 2012). Тогда специфические Т-клеточные ответы и снижение количества опухолевых клеток можно легко наблюдать, иммунные ответы носят кратковременный характер.

В нескольких исследованиях в качестве антигенпрезентирующих клеток использовались аутологичные ДК, чтобы вызывать противоопухолевые ответы. ДК нагружали *ex vivo* опухолеассоциированными пептидами, лизатом цельных опухолевых клеток и полученной из опухоли РНК или ДНК. В другой стратегии цельные опухолевые клетки применяются для слияния с ДК и получения гибридных клеток ДК-В-ХЛЛ. Трансфицированные ДК инициировали как CD4+, так и CD8+ Т-клеточные ответы (Muller et al., 2004). Гибриды, полученные путем слияния, и ДК, нагруженные лизатом опухолевых клеток или апоптозными тельцами усиливали опухолеспецифические CD8+ Т-клеточные ответы. У пациентов, у которых наблюдался клинический ответ, повышается сывороточный уровень ИЛ-12 и снижается число регуляторных Т-лимфоцитов (Tregs) (Palma et al., 2008).

В различных подходах используются модифицированные опухолевые клетки в целях инициации или усиления ХЛЛ-специфических иммунных ответов. Примером такой стратегии является получение клеток-триом: клетки В-ХЛЛ сливают с клетками гибридомы, экспрессирующими антитела к Fc-рецептору и имеющими специфичность к анти-АПК. Клетки, полученные по триомной технологии, вызывали ХЛЛ-специфические ответы Т-клеток *in vitro* (Kronenberger et al., 2008).

В другой стратегии используется вакцина на основе облученных аутологичных клеток ХЛЛ с бациллой *Bacillus Calmette-Guérin* (БЦЖ) в качестве адъюванта. У нескольких пациентов наблюдалось снижение уровня лейкоцитов или стабильное заболевание (Hus et al., 2008).

Кроме выделенных из ХЛЛ клеток, цельную кровь пациентов с ХЛЛ использовали в качестве вакцины после ее обработки в отделении гематологии. Вакцина вызывала ХЛЛ-специфические ответы Т-клеток и приводила к частичным клиническим ответам или стабильному заболеванию у нескольких пациентов (Spaner et al., 2005).

Несколько ТАА избыточно экспрессируются клетками ХЛЛ и подходят для вакцин. Они включают фибромодулин (Mayr et al., 2005), RHAMM/CD168 (Giannopoulos et al., 2006), MDM2 (Mayr et al., 2006), hTERT (Counter et al., 1995), белок раково-эмбрионального антиген-незрелого рецептора ламинина (OFAiLRP) (Siegel et al., 2003), адипофилин (Schmidt et al., 2004), сурвивин (Granziero et al., 2001), KW1 - KW14 (Krackhardt et al., 2002) и полученный из опухоли участок IgVHCDR3 (Harig et al., 2001; Carballido et al., 2012). Было проведено клиническое исследование фазы I с применением полученного из белка RHAMM пептида R3 в качестве вакцины. 5 из 6 пациентов имели поддающиеся обнаружению R3-специфические CD8+ Т-клеточные ответы (Giannopoulos et al., 2010).

### *Колоректальный рак*

В зависимости от стадии колоректального рака (КРК), для лечения рака толстой и прямой кишки имеются различные виды стандартной терапии. Стандартные процедуры включают хирургическую операцию, лучевую терапию, химиотерапию и таргетную терапию для КРК (Berman et al., 2015a; Berman et al., 2015b).

Удаление опухоли является необходимым шагом в лечении КРК. Для химиотерапии используются препараты капецитабин или 5-фторурацил (5-FU). Для комбинированной химиотерапии рекомендуется использование коктейля препаратов, содержащего 5-FU, лейковорин и оксалиплатин (FOLFOX) (Stintzing, 2014; Berman et al., 2015b). Кроме химиотерапевтических препаратов пациентам с заболеванием на поздних стадиях вводят несколько моноклональных антител, мишенями которых являются рецептор эпидермального фактора роста (EGFR, цетуксимаб, панитумумаб) или сосудистый эндотелиальный фактор роста-A (VEGF-A, бевацизумаб). Для терапии второй и более поздних линий могут использоваться ингибитор VEGF афлиберцепт, ингибитор тирозинкиназы регорафениб и ингибитор тимидилатсинтазы TAS-102 и ингибитор дУТФазы TAS-114 (Stintzing, 2014; Wilson et al., 2014).

В последних клинических исследованиях в качестве варианта лечения КРК анализируется активная иммунотерапия. Ее стратегии включают вакцинацию пептидами из опухолеассоциированных антигенов (ТАА), цельными опухолевыми клетками, вакцинами на основе дендритных клеток (ДК) и вирусными векторами (Koido et al., 2013).

Пептидные вакцины до сих пор были направлены на раковоэмбриональный антиген (CEA), муцин 1, EGFR, антиген плоскоклеточной карциномы, распознаваемый Т-клетками 3 (SART3), человеческий хориогонадотропин-бета (бета-ХГЧ), антиген опухоли Уильмса 1 (WT1), сурвивин-2B, MAGE3, p53, белок с доменом *ring finger* 43 и транслоказу внешней митохондриальной мембраны 34 (ТОММ34) или имеющий мутации белок KRAS. В нескольких клинических исследованиях фазы I и II у пациентов наблюдались антиген-специфические ответы ЦТЛ или выработка антител. В отличие от иммунологических ответов многие пациенты не получают пользы от пептидных вакцин на клиническом уровне (Koido et al., 2013; Miyagi et al., 2001; Moulton et al., 2002; Okuno et al., 2011).

Вакцины на основе дендритных клеток (ДК) включают ДК, нагруженные полученными из ТАА пептидами, лизатами опухолевых клеток, апоптотическими опухолевыми клетками или опухолевой РНК или продуктами слияния ДК и опухолевых клеток. В то время как у многих пациентов во время исследований фазы I/II наблюдались специфические иммунные ответы, клиническую пользу получило лишь меньшинство пациентов (Koido et al., 2013).

Вакцины на основе цельных опухолевых клеток состоят из аутологических опухолевых клеток, модифицированных таким образом, чтобы секретировать ГМ-КСФ. Модификация осуществляется под воздействием излучения или с помощью инфицированных вирусом облученных клеток. Большинство пациентов не получило клинической пользы в нескольких клинических исследованиях II/ III фазы (Koido et al., 2013).

Вирус коровьей оспы или птичий вирус оспы с дефектом репликации, кодирующий СЕА (раковозмбриональный антиген), а также В7.1, ICAM-1 и LFA-3 использовали в качестве носителей в клинических исследованиях I фазы вакцин на основе вирусных векторов. В другом исследовании использовали нереплицируемый вирус оспы канареек, кодирующий СЕА, и В7.1. Кроме индукции СЕА-специфических Т-клеточных ответов, 40% пациентов продемонстрировали объективные клинические ответы (Horig et al., 2000; Kaufman et al., 2008).

### *Рак пищевода*

Иммунотерапия может быть новым многообещающим подходом в лечении распространенного рака пищевода. Было продемонстрировано, что несколько ассоциированных с раком генов и раково-тестикулярных антигенов избыточно экспрессируются при раке пищевода, включая различные гены семейства MAGE, NY-ESO-1 и EpCAM (Kimura et al., 2007; Liang et al., 2005; Inoue et al., 1995; Bujas et al., 2011; Tanaka et al., 1997; Quillien et al., 1997). Эти гены представляют собой крайне интересные мишени иммунотерапии, и большинство из них сейчас исследуются в целях лечения других злокачественных заболеваний (ClinicalTrials.gov, 2015). Кроме того, при раке пищевода описывался повышенный уровень PD-L1 и PD-L2, что коррелировало с неблагоприятным прогнозом. Таким образом, пациенты с раком пищевода с PD-L1-положительными опухолями, возможно, получают пользу от иммунотерапии, мишенью которой является PD-L1 (Ohigashi et al., 2005).

До сих пор имеющиеся клинические данные о иммунотерапевтических подходах при лечении рака пищевода остаются относительно скудными, поскольку было завершено лишь ограниченное количество клинических исследований ранней фазы. Вакцину, состоящую из трех пептидов, полученных из трех различных раково-тестикулярных антигенов (протеинкиназа ТТК, комплекс лимфоцитарного антигена 6 locus К и инсулиноподобный фактор роста-связывающий мРНК белок 3 (IGF)-II), вводили пациентам с распространенным раком пищевода в рамках клинического исследования фазы I с получением результатов умеренного

характера. Введение внутрь опухоли активированных Т-клеток после их стимуляции *in vitro* аутологичными злокачественными клетками вызывало полные или частичные ответы опухоли у четырех из одиннадцати пациентов в исследовании I/II фазы (Toomey et al., 2013). Вакцину, состоящую из трех пептидов, полученных из трех различных раково-тестикулярных антигенов (протеинкиназа ТТК, комплекс лимфоцитарного антигена 6 locus К и белок 3, связывающий мРНК инсулиноподобного фактора роста (IGF)-II), вводили пациентам с распространенным раком пищевода в рамках клинического исследования фазы I с получением умеренных результатов (Kono et al., 2009). Введение внутрь опухоли активированных Т-клеток после их стимуляции *in vitro* аутологичными злокачественными клетками и интерлейкином 2 вызывало полные или частичные ответы опухоли у четырех из одиннадцати пациентов в исследовании I/II фазы (Toh et al., 2000; Toh et al., 2002). Сейчас ведутся другие клинические исследования для оценки влияния иммунотерапии на рак пищевода, включая адоптивную клеточную терапию (NCT01691625, NCT01691664, NCT01795976, NCT02096614, NCT02457650), стратегии вакцинации (NCT01143545, NCT01522820) и терапию анти-PD-L1 препаратами (NCT02340975) (ClinicalTrials.gov, 2015).

#### *Рак желудка*

Применяемые сейчас схемы лечения распространенного РЖ малоэффективны, приводя к низкому уровню 5-летней выживаемости. Иммунотерапия могла бы стать альтернативным подходом в целях улучшения выживаемости пациентов с РЖ. Адоптивный перенос опухолеассоциированных лимфоцитов и цитокин-индуцированных киллерных клеток, вакцины на основе пептидов, мишенью которых являются HER2/neu, MAGE-3 или рецептор сосудистого эндотелиального фактора роста 1 и 2, и вакцины на основе дендритных клеток, мишенью которых является HER2/neu, показали многообещающие результаты в рамках клинических исследований РЖ. Ингибирование иммунных контрольных точек и полученные методом генной инженерии Т-клетки могут стать дополнительными вариантами лечения, сейчас они проходят оценку в доклинических и клинических исследованиях (Matsueda and Graham, 2014).

### *Глиобластома*

Существует крайне мало вариантов лечения глиобластомы (ВОЗ IV степени). Было проведено исследование различных иммунотерапевтических подходов для лечения глиобластомы, включая ингибирования иммунных контрольных точек, вакцинацию и адоптивный перенос полученных методом генной инженерии Т-клеток.

Как было продемонстрировано, антитела к ингибиторным Т-клеточным рецепторам или их лигандам эффективно усиливают опосредованные Т-клетками иммунные ответы против опухоли при различных видах рака, включая меланому и рак мочевого пузыря. Воздействие антител, активирующих Т-клетки, таких как ипилимумаб и ниволумаб, проходит оценку в клинических исследованиях глиобластомы, однако предварительные данные указывают на побочные эффекты, связанные с аутоиммунными реакциями.

Сейчас проводятся исследования различных стратегий вакцинации для пациентов, больных глиобластомой, в том числе вакцин на основе пептидов, белков теплового шока, аутологичных вакцин на основе опухолевых клеток, дендритных клеток и вирусных белков. Чтобы вызвать противоопухолевый иммунный ответ у пациентов с глиобластомой в данных подходах используются пептиды, полученные из глиобластома-ассоциированных белков, таких как рецептор эпидермального фактора роста вариант III (EGFRvIII) или белков теплового шока или дендритных клеток, обработанных лизатом аутологичных опухолевых клеток или компонентами цитомегаловируса. Несколько из этих исследований обнаружили хорошие профили безопасности и переносимости, а также показали многообещающие результаты по эффективности.

Адоптивный перенос генетически измененных Т-клеток является дополнительным иммунотерапевтическим подходом к лечению глиобластомы. В настоящее время в различных клинических исследованиях производят оценку безопасности и

эффективности Т-клеток, несущих химерный антигенный рецептор HER2, рецептора альфа 2 ИЛ-13 и EGFRvIII (Ampie et al., 2015).

### *Рак печени*

Варианты лечения при распространенной нерезектабельной ГЖК ограничены применением сорафениба, мультитирозинкиназного ингибитора (Chang et al., 2007; Wilhelm et al., 2004). Сорафениб является единственным препаратом системного действия, который, как было подтверждено, увеличивает выживаемость примерно на 3 месяца, и на сегодняшний день представляется собой единственный экспериментальный вариант лечения для таких пациентов (Chapiro et al., 2014; Llovet et al., 2008). В последнее время было проведено небольшое число клинических исследований применения иммунотерапии при лечении ГЖК. Для активации субпопуляций иммунных клеток и(или) повышения иммуногенности опухоли использовали цитокины (Reinisch et al., 2002; Sangro et al., 2004). Другие клинические исследования были сфокусированы на инфузии опухоле-инфильтрующих лимфоцитов или активированных лимфоцитов периферической крови (Shi et al., 2004; Takayama et al., 1991; Takayama et al., 2000).

До сих пор было проведено небольшое число клинических исследований терапевтической вакцинации. Butterfield и соавторы провели два исследования с применением пептидов, полученных из альфа-фетопротейна (АФП), в качестве вакцины или дендритных клеток, нагруженных *ex vivo* пептидами из АФП (Butterfield et al., 2003; Butterfield et al., 2006). В двух различных исследованиях аутологичные дендритные клетки (ДК) нагружали *ex vivo* аутологичным опухолевым лизатом (Lee et al., 2005) или лизатом клеток гепатобластомы линии HepG2 (Palmer et al., 2009). До сих пор клинические исследования вакцин показали лишь незначительное улучшение клинических исходов.

### *Меланома*

Усиление иммунных ответов против опухоли, по-видимому, является многообещающей стратегией для лечения меланомы распространенной формы. В

Соединенных Штатах ингибитор иммунной контрольной точки ипилимумаб, а также ингибиторы киназ BRAF, вемурафениб и дабрафениб, и ингибитор MEK, траметиниб, уже одобрены для лечения распространенной формы меланомы. Оба подхода усиливают противоопухолевый иммунитет пациента: ипилимумаб – непосредственно снижая ингибирование Т-клеток, а ингибиторы киназ – косвенно усиливая экспрессию меланоцитарных дифференцирующих антигенов. Дополнительные ингибиторы контрольной точки (ниволумаб и ламбролизумаб) сейчас изучаются в клинических исследованиях, и получены первые обнадеживающие результаты. Кроме того, в клинических исследованиях изучаются различные комбинированные терапии, направленные на вызывание противоопухолевых иммунных ответов. К ним относятся ипилимумаб в комбинации с ниволумабом, ипилимумаб в комбинации с полученной из gp100 пептидной вакциной, ипилимумаб в комбинации с дакарбазином, ипилимумаб в комбинации с ИЛ-2 и ипилимумаб в комбинации с ГМ-КСФ (Srivastava and McDermott, 2014).

Уже была проведена оценка нескольких различных подходов по вакцинации пациентов с распространенной меланомой. До сих пор клинические исследования фазы III дали скорее неутешительные результаты, и стратегии вакцинации, несомненно, необходимо улучшать. Поэтому новые клинические исследования, как, например, исследование ГМ-КСФ OncoVEX или исследование DERMA, направлены на улучшение клинической эффективности без снижения переносимости (<http://www.cancerresearchuk.org>).

Адоптивный перенос Т-клеток проявляет многообещающий потенциал для лечения меланомы поздних стадий. Культивированные *in vitro* аутологичные опухоле-инфильтрующие лимфоциты, а также Т-клетки, несущие Т-клеточный рецептор с высокой аффинностью к раково-тестикулярному антигену NY-ESO-1, оказывают существенное полезное воздействие и обладают низкой токсичностью при введении пациентам с меланомой. К сожалению, Т-клетки с Т-клеточными рецепторами с высокой аффинностью к меланоцит-специфическим антигенам MART1 и gp100 и к раково-тестикулярному антигену MAGEA3 в рамках клинических

исследований вызывали значительные токсические эффекты. Таким образом, адоптивный перенос Т-клеток обладает высоким терапевтическим потенциалом, однако требуется дальнейшее повышение безопасности и переносимости данных способов лечения (Phan and Rosenberg, 2013; Hinrichs and Restifo, 2013).

#### *Немелкоклеточный рак легких*

Так как на момент своего обнаружения заболевание обычно уже распространено, часто используются лучевая терапия и химиотерапия, иногда в сочетании с хирургической операцией (S3-Leitlinie Lungenkarzinom, 2011). В целях расширения числа возможных способов лечения НМРЛ были изучены или продолжают исследоваться различные иммунотерапевтические подходы. В то время как с помощью вакцинации L-BLP25 или MAGEA3 у пациентов с НМРЛ не удалось продемонстрировать преимуществ по выживаемости, при введении вакцин, одна вакцина на основе аллогенной клеточной линии показала многообещающие результаты в рамках клинических исследований. Кроме того, в настоящий момент ведутся клинические исследования вакцин, мишенями которых являются ганглиозиды, рецептор эпидермального фактора роста и несколько других антигенов. Альтернативная стратегия для усиления противоопухолевого Т-клеточного ответа пациента состоит в блокировке ингибирующих Т-клеточных рецепторов или их лигандов специфическими антителами. Терапевтический потенциал нескольких из этих антител, включая ипилимумаб, ниволумаб, пембролизумаб, MPDL3280A и MEDI-4736, при НМРЛ оцениваются сейчас в клинических исследованиях (Reinmuth et al., 2015).

#### *Рак яичника*

Иммунотерапия, по-видимому, является многообещающей стратегией по усовершенствованию лечения пациентов с раком яичника, поскольку присутствие провоспалительных опухоль-инфильтрующих лимфоцитов, в частности CD8-положительных Т-клеток, коррелирует с благоприятным прогнозом, и Т-клетки, специфичные к опухолиассоциированным антигенам могут быть выделены из раковой ткани.

В связи с этим проводится интенсивная научная работа по исследованию различных видов иммунотерапии рака яичника. Значительное число доклинических и клинических исследований уже было проведено, и дальнейшие исследования ведутся сейчас. Имеются клинические данные для терапии с применением цитокинов, вакцинации, лечения моноклональными антителами, адоптивного клеточного переноса и иммуномодуляции.

Цитокиновая терапия с применением интерлейкина-2, интерферона-альфа, интерферона-гамма или гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора направлена на усиление противоопухолевого иммунного ответа самого пациента, и эти виды лечения уже продемонстрировали обнадеживающие результаты в небольших когортах исследования.

Клинические исследования вакцинации I и II фазы с применением одного или нескольких пептидов, полученных из нескольких опухолеассоциированных белков (Her2/neu, NY-ESO-1, p53, белка опухоли Вильмса-1) или цельных опухолевых антигенов, полученных из аутологических опухолевых клеток, продемонстрировали хорошие профили безопасности и переносимости, однако лишь низкую до умеренной клиническую эффективность.

Считается, что моноклональные антитела, которые специфически распознают опухолеассоциированные белки, усиливают уничтожение опухолевых клеток, опосредованное иммунными клетками. Антитела к CA-125, ореговомаб и абаговомаб, а также антитело к EpCAM, катумаксомаб, продемонстрировали многообещающие результаты в клинических исследованиях II и III фаз. Однако антитело к MUC1, HMFG1, не смогло явно улучшить выживаемость на III фазе клинического исследования.

Для нацеливания на и блокировки фактора роста и рецепторов выживаемости на опухолевых клетках в альтернативном подходе применяются моноклональные

антитела. Тогда как введение трастузумаба (антитело к HER2/neu) и MOv18 и MORAb-003 (антитела к рецептору фолиевой кислоты альфа) давало лишь ограниченную клиническую пользу пациентам с раком яичника, применение бевацизумаба (антитело к VEGF) в дополнение к стандартной химиотерапии при раке яичника поздних стадий, по-видимому, обладает преимуществами.

Адоптивный перенос иммунных клеток привел в неоднородным результатам в рамках клинических исследований. Адоптивный перенос аутологичных, культивированных *in vitro* опухоль-инфильтрующих Т-клеток, как было показано в пилотном исследовании, является многообещающим подходом. Напротив, перенос Т-клеток с химерным антигенным рецептором, специфичным к рецептору фолиевой кислоты альфа, не приводил к значимому клиническому ответу в рамках исследования I фазы. Дендритные клетки, обработанные лизатом опухолевых клеток или опухолеассоциированными белками *in vitro*, как было показано, усиливают противоопухолевый Т-клеточный ответ при переносе, тем не менее степень активации Т-клеток не коррелировала с клинической эффективностью. В рамках исследования II фазы перенос естественных киллерных клеток вызывал значительные токсические эффекты.

Внутреннему противоопухолевому иммунитету, а также иммунотерапии препятствует иммуносупрессивное микроокружение опухоли. Чтобы преодолеть это препятствие, проводятся испытания иммуномоделирующих препаратов, таких как циклофосфамид, антитела к CD25 и пегилированный липосомальный доксорубин в комбинации с иммунотерапией. Наиболее достоверные данные имеются в настоящий момент для ипилимумаба, антитела к CTLA4, усиливающего активность Т-клеток. Ипилимумаб, как было показано, оказывает существенное противоопухолевое воздействие на пациентов с раком яичника (Mantia-Smaldone et al., 2012).

*Рак поджелудочной железы*

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

#### *Рак предстательной железы*

Основанная на дендритных клетках вакцина «сипулейцел-Т» стала первой противораковой вакциной, одобренной Управлением по контролю за продуктами питания и лекарственными средствами США (FDA). В связи с положительным влиянием на выживаемость пациентов с КРПЖ множество усилий прилагается для разработки дальнейших иммунотерапевтических методов. Что касается стратегий вакцинации, то многообещающие результаты в рамках различных клинических исследований показали пептидная вакцина на основе простат-специфического антигена (PSA)-TRICOM, персонализированная пептидная вакцина PPV, вакцина на основе ДНК pTVG-HP, вакцина на основе цельных клеток, экспрессирующих ГМ-КСФ, GVAX. Кроме того, вакцины на основе дендритных клеток, помимо сипулейцел-Т, а именно BPX-101 и DCVAC/Pa, как было показано, вызывают клинические ответы у пациентов с раком предстательной железы. Ингибиторы иммунных контрольных точек, такие как ипилимумаб и ниволумаб, в настоящее время проходят оценку в рамках клинических исследований в качестве монотерапии, а также в комбинации с другими методами лечения, включая антиандрогенную терапию, местную лучевую терапию, PSA-TRICOM и GVAX.

Исследования иммуномодулирующего средства тасквинимод, которое значительно уменьшало прогрессирование и повышало выживаемость без прогрессирования в рамках клинического исследования II фазы, сейчас продолжаются на III фазе. Леналидомид, другой иммуномодулятор, вызывал многообещающие эффекты в клинических исследованиях ранних фаз, однако не улучшил выживаемость на III фазе клинического исследования. Несмотря на эти неутешительные результаты, сейчас проводятся дальнейшие клинические испытания леналидомида (Quinn et al., 2015).

#### *Почечно-клеточная карцинома*

Известная иммуногенность ПКК обуславливает применение иммунотерапии и противораковых вакцин при распространенной ПКК. Интересная корреляция между экспрессией лимфоцитов PD-1 и распространенной ПКК, степенью злокачественности и прогнозом течения, а также селективной экспрессией PD-L1 опухолевыми клетками ПКК и ее потенциальной ассоциацией с худшими клиническими исходами, привели к разработке новых средств на основе антител к PD-1/PD-L1 в отдельности или в комбинации с антиангиогенными лекарственными средствами или другими иммунотерапевтическими подходами для лечения ПКК (Massari et al., 2015). Для ПКК поздних стадий в рамках клинического исследования противораковой вакцины III фазы TRIST проводится оценка того, продлевается ли выживаемость пациентов с ПКК локально-распространенной или метастатической стадии при лечении TroVax (вакциной с применением опухолеассоциированного антигена 5T4, с поксвирусным вектором) в дополнение к стандартной терапии первой линии. Медиана выживаемости не была достигнута ни в одной из групп с 399 пациентами (54%), продолжающих исследование, тем не менее анализ данных подтверждает полученные ранее клинические результаты, демонстрируя, что вакцина TroVax является иммунологически активной, и что существует корреляция между интенсивностью ответа на 5T4-специфические антитела и улучшением выживаемости. Далее проводятся несколько исследований пептидных вакцин с применением эпитопов, избыточно экспрессируемых клетками ПКК.

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

#### *Мелкоклеточный рак легких*

Появилось множество инноваций в отношении обнаружения, диагностики и лечения МРЛ. Было продемонстрировано, что применение КТ-сканирования вместо рентгенографии в целях выявления рака на ранних стадиях снизило риск смертельного исхода от рака легких. Сейчас диагностика МРЛ может быть подтверждена флуоресцентной или виртуальной бронхоскопией, лучевая терапия может проводиться с визуализацией опухоли в режиме реального времени. Новые антиангиогенные препараты, как, например, бевацизумаб (Авастин), сунитиниб (Сутент) и нинтеданиб (BIBF 1120), как было продемонстрировано, оказывают терапевтические эффекты при лечении МРЛ (American Cancer Society, 2015). Иммунотерапия представляет собой широко исследованную область терапии рака. Большое количество подходов используются при лечении МРЛ. Цель одного из подходов – блокировка CTLA-4, супрессора естественного иммунитета человека. Ингибирование CTLA-4 направлено на стимулирование иммунной системы для борьбы с раком. Недавно была начата разработка многообещающих ингибиторов иммунных контрольных точек для лечения МРЛ. Другой подход основан на противораковых вакцинах и доступен сейчас для лечения МРЛ в рамках клинических исследований (American Cancer Society, 2015; National Cancer Institute (NCI), 2011).

#### *Острый миелоидный лейкоз*

Один вариант лечения направлен на воздействие на CD33 с помощью препарата, конъюгированного с антителами (антитела к CD33 + калихеамицина, SGN-CD33a,

антитела к CD33 + актиния-225), биспецифичных антител (распознавание CD33 + CD3 (AMG 330) или CD33 + CD16) и химерных антигенных рецепторов (CAR) (Estey, 2014).

#### *Неходжкинская лимфома (НХЛ)*

Лечение НХЛ зависит от гистологического типа и стадии заболевания (National Cancer Institute, 2015). У пациентов с лимфомой может наблюдаться спонтанная регрессия опухоли. Поэтому одним из вариантов лечения является активная иммунотерапия (Palomba, 2012). Важный способ вакцинации включает идиотипические вакцины. В-лимфоциты экспрессируют поверхностные иммуноглобулины со специфической аминокислотной последовательностью на переменных участках их тяжелой и легкой цепей, уникальной для каждого клона клетки (= идиотип, Id). Идиотип выполняет функцию опухолеассоциированного антигена. Пассивная иммунизация включает введение с помощью инъекции рекомбинантных мышинных моноклональных антител к Id в отдельности или в комбинации с IFNальфа, ИЛ-2 или хлорамбуцилом.

Активная иммунизация включает введение рекомбинантного белка (Id), конъюгированного с адъювантом (гемоцианин фиссуреллы, KLH), вводимого вместе с ГМ-КСФ в качестве иммуностимулятора. Опухолеспецифический идиотип получают на основе гибридных культур или при использовании рекомбинантных ДНК (плазмид) путем экспрессии в клеточных клетках бактерий, насекомых или млекопитающих. Было проведено три клинических исследования III фазы (Biovest, Genitope, Favril). В двух исследованиях пациенты получали ритуксимаб. ГМ-КСФ вводили во всех трех исследованиях. В исследовании Biovest использовали белок, полученный по гибридной технологии, в исследованиях Genitope и Favril – рекомбинантный белок. Во всех трех исследованиях Id конъюгировали с гемоцианином фиссуреллы (KLH). Лишь исследование Biovest дало значимый результат.

Вакцины, отличные от Id, включают раково-тестикулярные антигены MAGE, NY-ESO1 и PASD-1, В-клеточный антиген CD20 или вакцины на основе клеток. Последнее из упомянутых состоит из ДК, обработанных апоптотическими опухолевыми клетками, лизатом из опухолевых клеток, гибридов ДК и опухолевых клеток или ДК, обработанных РНК, полученной из опухоли. Вакцинация *in situ* включает вакцинацию интратуморальными CpG в комбинации с химиотерапией или облученными опухолевыми клетками, выращенными в присутствии ГМ-КСФ и сбор/ инкубацию/ повторное введение Т-клеток. В вакцинацию антителами, вносящими изменения в иммунологические контрольные точки, входят антитела к CD40, OX40, 41BB, CD27, GITR (антитело-агонисты, которые напрямую усиливают противоопухолевый ответ) или антитела к PD1, CTLA-4 (блокирующие антитела, которые ингибируют контрольную точку, которая препятствовала бы иммунному ответу). Примерами являются ипилимумаб (антитело к CTLA-4) и CT-011 (антитело к PD1) (Palomba, 2012).

#### *Рак матки*

Также имеется несколько иммунотерапевтических подходов, которые сейчас проходят испытания. В рамках клинического исследования I/II фазы проводили вакцинацию пациентов, страдающих от рака матки, аутологичными дендритными клетками (ДК) с введенным с помощью электропорации мРНК гена опухоли Уильмса 1 (WT1). За исключением одного случая местной аллергической реакции на адъювант, других неблагоприятных побочных реакций не наблюдалось, и у 3 из 6 пациентов наблюдался иммунологический ответ (Coosemans et al., 2013).

Как утверждалось выше, инфекция вируса человеческой папилломы (HPV) провоцирует очаги поражения, которые в конечном итоге могут привести к раку шейки матки. Таким образом, онкобелки вируса HPV, E6 и E7, которые конститутивно экспрессировались в очагах и раковых опухолях высокой степени злокачественности и необходимы для появления и сохранения злокачественного фенотипа, рассматриваются как многообещающие мишени в иммунотерапевтическом подходе (Hung et al., 2008; Vici et al., 2014). В рамках

одного из клинических исследований лечение пациенток с метастатическим раком шейки матки проводили с помощью адоптивной Т-клеточной терапии (АСТ). Пациентки получали инфузию из опухоль-инфильтрирующих Т-клеток (TILs), реагирующих с Е6 и Е7, что привело к полной регрессии у 2 и частичному ответу у 1 из 9 пациенток (Stevanovic et al., 2015). Более того, сообщалось, что внутриклеточные антитела, мишенью которых является Е7, блокируют рост опухоли у мышей (Accardi et al., 2014). Также проводятся клинические исследования вакцин на основе пептидов, ДНК и ДК, мишенями которых являются Е6 и Е7 вируса HPV (Vici et al., 2014).

#### *Аденокарцинома и холангиокарцинома желчного пузыря*

Холангиокарцинома (ХК) выявляется, в основном, на поздних стадиях, поскольку ее сложно диагностировать. Рак желчного пузыря (РЖП) является наиболее распространенным и агрессивным злокачественным заболеванием желчевыводящих путей в мире. В случае рака желчного пузыря лишь 10% опухолей являются резектабельными, и даже после операции большинство из них прогрессирует с развитием метастазов, прогноз при этом даже хуже, чем для холангиокарциномы, и 5-летняя выживаемость составляет менее 5%. Хотя большинство опухолей являются нерезектабельными, до сих пор не существует эффективной адъювантной терапии (Rakic et al., 2014). В некоторых исследованиях было продемонстрировано, что комбинация химиотерапевтических препаратов или таргетной терапии (анти-VEGFR/EGFR препараты) с химиотерапией приводила к увеличению общей выживаемости и может быть многообещающим вариантом лечения в будущем (Kanthan et al., 2015). В связи с редкостью карцином желчевыводящих путей в целом проводится лишь немного посвященных конкретно РЖП или ХК клинических исследований, тогда как большинство из них включает все виды рака желчевыводящих путей. Это является причиной того, что способ лечения не улучшился на протяжении последних десятилетий, и резекция R0 остается до сих пор единственным вариантом радикального лечения.

#### *Рак мочевого пузыря*

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

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). Одобрённой FDA терапией второй линии для пациентов с НМИ РМП, БЦЖ-терапия для которых оказалась неэффективной, и которые хотели бы сохранить мочевой 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.

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., 2015; Grivas et al., 2015; Jones et al., 2016; Rouanne et al., 2016).

#### *Плоскоклеточная карцинома головы и шеи*

Плоскоклеточные карциномы головы и шеи (ПлККГШ) – это гетерогенные опухоли с различиями в эпидемиологии, этиологии и способе лечения (Economidou et al., 2016). Лечение ПлККГШ на ранних стадиях охватывает применение одного метода лечения – хирургического или лучевой терапии (World Health Organization, 2014).

Лечение раковых опухолей на поздних стадиях проводится комбинацией химиотерапии с хирургической операцией и/или лучевой терапией.

ПлККПШ считается иммунодепрессивным заболеванием, характеризующимся нарушением регуляции иммунокомпетентных клеток и секреции цитокинов (Economidou et al., 2016). Иммунотерапевтические стратегии делают различие между HPV-отрицательными и HPV-положительными опухолями.

При HPV-положительных опухолях вирусные онкобелки E6 и E7 представляют собой хорошие мишени, поскольку они постоянно экспрессируются опухолевыми клетками и являются необходимыми для поддержания трансформационного статуса HPV-положительных раковых клеток. Сейчас ведется исследование нескольких видов терапии на основе вакцины для показателя HPV-положительная ПлККПШ, включая вакцины на основе ДНК, пептидов и вакцины, включающие дендритные клетки (ДК). Кроме того, в проходящем сейчас клиническом исследовании II фазы изучается эффективность разрушения лимфоцитов с последующим введением аутологичных инфильтрующих опухоль лимфоцитов (ИОЛ) пациентам с HPV-положительными опухолями (Economidou et al., 2016).

При HPV-отрицательных опухолях сейчас применяется и находится на исследовании несколько иммунотерапевтических стратегий. Химерное моноклональное антитело IgG1 к EGFR, цетуксимаб, было одобрено FDA в комбинации с химиотерапией в качестве стандартного лечения первой линии при рецидивирующей/метастатической ПлККПШ. Другие препараты на основе моноклональных антител к EGFR, включая панитумумаб, нимотузумаб и залутумумаб, проходят оценку для лечения ПлККПШ. Несколько ингибиторов иммунных контрольных точек проходят оценку в клинических исследованиях для их применения при ПлККПШ. Они включают следующие антитела: ипилимумаб (антитело к CTLA-4), тремелимумаб (антитело к CTLA-4), пембролизумаб (антитело к PD-1), ниволумаб (антитело к PD-1), дурвалумаб (антитело к PD-1), антитело к KIR, урелумаб (антитело к CD137) и антитело к LAG-3.

В двух клинических исследованиях с участием пациентов с ПлККГШ оценивали применение ДК, нагруженных пептидами р53 или апоптотическими опухолевыми клетками. Иммунологические ответы были удовлетворительными, а побочные эффекты – приемлемыми. Было проведено несколько исследований с использованием адоптивной Т-клеточной терапии (АСТ). Т-клетки были простимулированы либо по отношению к облученным аутологичным опухолевым клетками, либо к EBV. Результаты относительно контроля заболевания и общей выживаемости были обнадеживающими (Economopoulou 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 глиобластомы (ГБ), рака молочной железы (РМЖ), колоректального рака (КРК), почечноклеточной карциномы (ПКК), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), гепатоклеточной карциномы (ГКК), немелкоклеточного и мелкоклеточного рака легких (НМРЛ, МРЛ), неходжкинской лимфомы (НХЛ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), рака яичника (РЯ), рака поджелудочной железы (РПЖ), рака предстательной железы (РПрЖ), рака пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода (РП), рака желчного пузыря и холангиокарциномы (РЖП, ХК), меланомы (МЕЛ), рака желудка (РЖ), рака мочевого пузыря (РМП), плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПлККГШ) и рака матки (РЭМ), в частности. Также существует необходимость идентифицировать факторы, представляющие собой биомаркеры рака в целом и упомянутых выше видов рака в частности, что позволит лучше ставить диагноз, составлять прогноз и предсказывать успех лечения.

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

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

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

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

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

г) Опухолеспецифические антигены: данные уникальные ТАА образуются в результате мутаций нормальных генов (таких как  $\beta$ -катенин, CDK4 и т. д.).

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

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

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

Мишенями иммунотерапии, основанной на Т-клетках, являются пептидные эпитопы, полученные из опухолеассоциированных или опухолеспецифических белков, которые презентуются молекулами главного комплекса гистосовместимости человека (МНС). Антигены, которые распознаются опухолеспецифическими Т-лимфоцитами, то есть их эпитопами, могут быть молекулами, образованными из любого класса белков, таких как ферменты,

рецепторы, факторы транскрипции и т. д., которые экспрессируются и, по сравнению с не измененными клетками того же происхождения, обычно имеют повышенный уровень в клетках соответствующей опухоли.

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

Молекулы МНС I класса встречаются на большинстве клеток, имеющих ядро. Они презентируют 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 опухолиассоциированных антигенов (ТАА), может быть чрезвычайно важна для разработки фармацевтических препаратов для инициации противоопухолевых иммунных ответов (Gnjatic et al., 2003). В месте локализации опухоли Т-хелперные клетки поддерживают благоприятное для ЦТЛ цитокиновое окружение (Mortara et al., 2006) и привлекают эффекторные клетки, к примеру, ЦТЛ, естественные киллерные клетки (NK), макрофаги, гранулоциты (Hwang et al., 2007).

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

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

Т-хелперные клетки, активированные эпитопами МНС II класса, играют важную роль в управлении эффекторной функцией ЦТЛ в противоопухолевом иммунитете. Эпитопы Т-хелперных клеток, иницирующие ответы Т-хелперных клеток типа TH1, поддерживают эффекторные функции CD8-положительных киллерных Т-клеток, которые включают цитотоксические функции, направленные против опухолевых клеток, проявляющих комплексы опухолиассоциированный пептид / МНС на их клеточной поверхности. Таким образом, опухолиассоциированные пептидные эпитопы Т-хелперных клеток, одни или в комбинации с другими опухолиассоциированными 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 MHC 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 MHC I класса + пептидный эпитоп), так и CD4-положительными хелперными Т-клетками (лиганд: молекула MHC II класса + пептидный эпитоп) являются важными при разработке противоопухолевых вакцин.

Для того чтобы пептид MHC I класса инициировал (вызывал) клеточный иммунный ответ, он также должен связываться с молекулой MHC. Этот процесс зависит от аллеля молекулы MHC и специфических полиморфизмов аминокислотной последовательности пептида. Пептиды, связывающиеся с MHC 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 MHC. Таким образом, каждый аллель MHC 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: 289, SEQ ID NO: 305 и SEQ ID NO: 306 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: 289, SEQ ID NO: 305 и SEQ ID NO: 306 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 полноразмерным полипептидом.

Тогда как наиболее важным критерием для пептида для выполнения функций мишени противораковой терапии является его избыточная презентация на первичных опухолевых тканях по сравнению с нормальными тканями, профиль экспрессии РНК соответствующего гена или экзона также может помочь выбрать подходящий пептиды. В частности, некоторые пептиды трудно поддаются обнаружению с помощью масс-спектрометрии как из-за их химических свойств, так и из-за малого числа их копий на клетках, и скрининговый подход, фокусирующийся на обнаружении презентации пептида, может оказаться безуспешным при идентификации этих мишеней. Тем не менее, эти мишени могут быть обнаружены альтернативным методом, в начале которого проводится анализ экспрессии генов и экзонов в опухолевых и нормальных тканях, а затем оценка презентации пептидов в опухолях. Этот подход применялся в рамках настоящего изобретения с использованием двух банков данных мРНК(исследовательской сети TCGA (Атлас ракового генома): <http://cancergenome.nih.gov/> для опухолевых образцов и банка данных GTEX (Lonsdale, 2013) для образцов нормальных тканей), а также данных о презентации пептидов. Если мРНК какого-либо гена или экзона в опухолевых

тканях экспрессируется в избытке по сравнению с нормальными тканями, то он рассматривается как опухолеассоциированный. Такие пептиды представляют собой интересные мишени, даже если они идентифицированы лишь на небольшом количестве (в процентном отношении) опухолевых тканей. Стандартный масс-спектрометрический анализ недостаточно чувствителен для оценки степени охвата мишеней на пептидном уровне. Вместо этого для оценки степени охвата может быть использована экспрессия опухолевой мРНК. Для обнаружения самого пептида может быть необходим целенаправленный подход с таргетной масс-спектрометрией с более высокой чувствительностью, чем рутинный скрининг, и он может привести к более точной оценке охвата на уровне презентации пептидов.

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: 289, SEQ ID NO: 305 и SEQ ID NO: 306, 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 289, SEQ ID NO: 305 и SEQ ID NO: 306, где указанный пептид или его вариант обладает общей длиной, составляющей 8 – 100, предпочтительно 8 – 30 и, наиболее предпочтительно, 8 – 14 аминокислот.

Настоящее изобретение далее относится к пептиду по настоящему изобретению, состоящему из последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 2, 24, 32, 39, 64, 72, 106, 149, 251, 305 и 306.

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 3, Таблицы 5 и Таблицы 7 (А+Б) связываются с HLA-A\*02. Все пептиды Таблицы 4, Таблицы 6 и Таблицы 8 связываются с HLA-A\*24. Пептиды Таблицы 5 и Таблицы 6 были раскрыты ранее в виде обширных списков в качестве результатов скринингов с

высокой пропускной способностью с высокой долей ошибок или были вычислены с помощью алгоритмов, однако ранее ни в коей мере не были ассоциированы с раковыми заболеваниями. Пептиды из Таблицы 7 (А+Б) и Таблицы 8 являются дополнительными пептидами, которые могут быть полезны в комбинации с другими пептидами по изобретению.

Таблица 3: Пептиды в соответствии с настоящим изобретением, связывающиеся с молекулами HLA-A\*02.

| SEQ ID No. | Последовательность | Идент. номер(а) гена   | Официальный(ые) символ(ы) гена |
|------------|--------------------|------------------------|--------------------------------|
| 1          | LLYPEPWSV          | 220382                 | FAM181B                        |
| 2          | GLIAGVVS           | 4233                   | MET                            |
| 3          | KLEENGDLYL         | 55255                  | WDR41                          |
| 4          | KLMPGTYTL          | 2201                   | FBN2                           |
| 5          | GIVAHIQEV          | 440193                 | CCDC88C                        |
| 6          | ALFDSL RHV         | 220382                 | FAM181B                        |
| 7          | ILDHEVPSL          | 199990                 | C1orf86                        |
| 8          | SIYQFLIAV          | 2237                   | FEN1                           |
| 9          | FLVDGSYSI          | 1303                   | COL12A1                        |
| 10         | GIAGSLKTV          | 3720                   | JARID2                         |
| 11         | ALSPSYLTV          | 57674                  | RNF213                         |
| 12         | GLLPLLHRA          | 100529261, 2342, 91612 | CHURC1-FNTB, FNTB, CHURC1      |
| 13         | ALMAMLVYV          | 91319                  | DERL3                          |
| 14         | ILAKDLFEI          | 83990                  | BRIP1                          |
| 15         | YLDLSHNQL          | 10333, 79883           | PODNL1, TLR6                   |
| 16         | YTLDIPVLFV         | 29028                  | ATAD2                          |
| 17         | AVFPDDMPTL         | 4297                   | MLL                            |
| 18         | ILLDLTDNRL         | 135228                 | CD109                          |
| 19         | SISDNWVEV          | 55589                  | BMP2K                          |
| 20         | GLSQITNQL          | 9736                   | USP34                          |
| 21         | AIQDEIRSV          | 4085                   | MAD2L1                         |
| 22         | FVDPNTQEKV         | 83481                  | EPPK1                          |
| 23         | SLFSDEFKV          | 102                    | ADAM10                         |
| 24         | TLDEKVAEL          | 51438                  | MAGEC2                         |
| 25         | TMDSVLVTV          | 94025                  | MUC16                          |
| 26         | ALQEELTEL          | 22995                  | CEP152                         |
| 27         | RLMEENWNA          | 7784                   | ZP3                            |
| 28         | SLPNGKPVSV         | 23682                  | RAB38                          |
| 29         | YLLDPSITL          | 10102                  | TSFM                           |
| 30         | AMIEEVFEA          | 221443                 | OARD1                          |
| 31         | TITETTVEV          | 7143                   | TNR                            |
| 32         | VQLDSIEDLEV        | 23532                  | PRAME                          |
| 33         | YIKTELISV          | 6772                   | STAT1                          |
| 34         | FLLATEVVTV         | 10075                  | HUWE1                          |
| 35         | FLLPFSTVYL         | 9204                   | ZMYM6                          |
| 36         | SLADTNSLAVV        | 6490                   | PMEL                           |
| 37         | ILAPFSVDL          | 85413                  | SLC22A16                       |
| 38         | FLGPRIIGL          | 202309                 | GAPT                           |
| 39         | HLLEGSGVG          | 85320                  | ABCC11                         |

|    |             |              |                  |
|----|-------------|--------------|------------------|
| 40 | VLIDPQWVLTA | 3003         | GZMK             |
| 41 | ALFENTPKA   | 5260         | PHKG1            |
| 42 | LLDSVSRL    | 3918         | LAMC2            |
| 43 | KAIEVLLTL   | 57650        | KIAA1524         |
| 44 | SLFETAWEA   | 9735         | KNTC1            |
| 45 | SLTEVSLPL   | 580          | BARD1            |
| 46 | SQFPLPLAV   | 80055        | PGAP1            |
| 47 | ALLERGELFV  | 79050        | NOC4L            |
| 48 | QVIEDSTGV   | 64778        | FNDC3B           |
| 49 | ALNIATHVL   | 24140        | FTSJ1            |
| 50 | ILFHGVFYA   | 55744        | COA1             |
| 51 | LLFSRLCGA   | 25945        | PVRL3            |
| 52 | RLAVLFSGA   | 968          | CD68             |
| 53 | KMVGLVVAI   | 80324        | PUS1             |
| 54 | VLNPLITAV   | 10827        | FAM114A2         |
| 55 | SLATKIVEA   | 152110       | NEK10            |
| 56 | FLHDEKEGIYI | 10225        | CD96             |
| 57 | TVFTDHMLTV  | 586          | BCAT1            |
| 58 | YLLPLLAL    | 338645       | LUZP2            |
| 59 | KLLDPQEFTL  | 3371         | TNC              |
| 60 | ALFAPLVHL   | 26251        | KCNG2            |
| 61 | AIVKEIVNI   | 4436         | MSH2             |
| 62 | ALNPELVQA   | 4233         | MET              |
| 63 | SQIPAQPSV   | 23215        | PRRC2C           |
| 64 | SLFPDSLIV   | 261729       | STEAP2           |
| 65 | SVVPDVRSV   | 6605         | SMARCE1          |
| 66 | KLIFSVEAV   | 65985        | AACS             |
| 67 | TLLQRLTEV   | 11064        | CNTRL            |
| 68 | SLSNRLYYL   | 9271         | PIWIL1           |
| 69 | FLAVGLVDV   | 28559        | TRBV28           |
| 70 | LLLGDALYL   | 28609, 28610 | TRBV5-6, TRBV5-5 |
| 71 | VLHSKFVVV   | 122618       | PLD4             |
| 72 | FLTAINYLL   | 440712       | C1orf186         |
| 73 | YTLREVDTV   | 4521         | NUDT1            |
| 74 | TLFGYSVVL   | 3676         | ITGA4            |
| 75 | AVIKFLELL   | 4436         | MSH2             |
| 76 | AVGPVHNSV   | 57448        | BIRC6            |
| 77 | TLIDEQDIPLV | 116225       | ZMYND19          |
| 78 | TVVTRLDEI   | 9459         | ARHGEF6          |
| 79 | VTFKEYVTV   | 8535         | CBX4             |
| 80 | KLYEADFVL   | 55501        | CHST12           |

|     |              |                        |                      |
|-----|--------------|------------------------|----------------------|
| 81  | NALDKVLSV    | 79053                  | ALG8                 |
| 82  | FIFDEAEKL    | 64222                  | TOR3A                |
| 83  | GQASYFYVA    | 4486                   | MST1R                |
| 84  | ALCPRIHEV    | 1762                   | DMWD                 |
| 85  | VLNDILVRA    | 5016                   | OVGP1                |
| 86  | SVDSHFQEV    | 4968                   | OGG1                 |
| 87  | TIYKDFVYI    | 79786                  | KLHL36               |
| 88  | AQADHLPQL    | 64689                  | GORASP1              |
| 89  | QLAPVFQRV    | 84342                  | COG8                 |
| 90  | FLQDLEQRL    | 128272                 | ARHGEF19             |
| 91  | KLFDESILI    | 8295                   | TRRAP                |
| 92  | GLLFSLRSV    | 79064                  | TMEM223              |
| 93  | QVLELDVADI   | 9675                   | TTI1                 |
| 94  | LLPAVPVGA    | 1953                   | MEGF6                |
| 95  | GLLGSLFFL    | 91319                  | DERL3                |
| 96  | LLVSHLYLV    | 84885                  | ZDHHC12              |
| 97  | STLPKSLSL    | 4605                   | MYBL2                |
| 98  | RLFPDFFTRVAL | 5657                   | PRTN3                |
| 99  | YLLQSVNQLLL  | 23347                  | SMCHD1               |
| 100 | ALLGMIIVGV   | 6571                   | SLC18A2              |
| 101 | ALADFMLS     | 2854                   | GPR32                |
| 102 | VLLDIQEVFQI  | 201305                 | SPNS3                |
| 103 | YLVSEIFKA    | 6005                   | RHAG                 |
| 104 | ALISWQPPRA   | 7143                   | TNR                  |
| 105 | ALLGTKILL    | 147945                 | NLRP4                |
| 106 | FINDSIVYL    | 89766                  | UMODL1               |
| 107 | LLVPTSGIYFV  | 4049                   | LTA                  |
| 108 | ILLKNLVTI    | 129868, 653192         | TRIM43, TRIM43B      |
| 109 | SLDPSVTHL    | 250, 251               | ALPPL2, ALPP         |
| 110 | FLLGVSKEV    | 23251                  | KIAA1024             |
| 111 | AIVDLIHD     | 23225                  | NUP210               |
| 112 | SLGKFTFDV    | 6676                   | SPAG4                |
| 113 | FLERGLESA    | 10535                  | RNASEH2A             |
| 114 | QLIQTLHAV    | 1004                   | CDH6                 |
| 115 | SLDPDTLPAV   | 352954, 389523, 729438 | GATSL2, GATS, GATSL1 |
| 116 | TIDESGSIL    | 29127                  | RACGAP1              |
| 117 | KMPDVELFV    | 79070                  | KDELC1               |
| 118 | QLWQFLVTL    | 2119                   | ETV5                 |
| 119 | FIIQGLRSVGA  | 3117, 3118             | HLA-DQA2, HLA-DQA1   |
| 120 | VTPVTVSAV    | 3054                   | HCFC1                |
| 121 | FTIFRTISV    | 83743                  | GRWD1                |

|     |            |                                            |                                                           |
|-----|------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| 122 | GVVDPVHGV  | 83481                                      | EPPK1                                                     |
| 123 | VLDPALPALV | 4486                                       | MST1R                                                     |
| 124 | KVMATIEKV  | 9274                                       | BCL7C                                                     |
| 125 | SLADYEHFV  | 357                                        | SHROOM2                                                   |
| 126 | QMFQYFITV  | 51290                                      | ERGIC2                                                    |
| 127 | KLDGNELDL  | 55379                                      | LRRC59                                                    |
| 128 | TQSPATLSV  | 28299, 28875, 28902,<br>28913, 3514, 50802 | IGKV1-5, IGKV3-15,<br>IGKV3D-15, IGKC,<br>IGKV1D-13, IGK@ |
| 129 | RLQDILWFL  | 150771                                     | ITPRIPL1                                                  |
| 130 | SLLGGTFVGI | 55266                                      | TMEM19                                                    |
| 131 | VTSNSGILGV | 22828                                      | SCAF8                                                     |
| 132 | ILGEVLAQL  | 124044                                     | SPATA2L                                                   |
| 133 | ALLPRLHQL  | 85414                                      | SLC45A3                                                   |
| 134 | GLAVPTPSV  | 647024                                     | C6orf132                                                  |
| 135 | HLSTIIHEA  | 1147                                       | CHUK                                                      |
| 136 | FLFGGVLMTL | 91319                                      | DERL3                                                     |
| 137 | EIASITEQL  | 55183                                      | RIF1                                                      |
| 138 | ALLAKILQI  | 5591                                       | PRKDC                                                     |
| 139 | FLLPTGAEA  | 1511                                       | CTSG                                                      |
| 140 | VLLEELEAL  | 10142                                      | AKAP9                                                     |
| 141 | FLDKVLVAA  | 54497                                      | HEATR5B                                                   |
| 142 | ILVEGISTV  | 1462                                       | VCAN                                                      |
| 143 | ALLPELREV  | 1140                                       | CHRNB1                                                    |
| 144 | ALLAFFPGL  | 80267                                      | EDEM3                                                     |
| 145 | YLWATIQR   | 2650                                       | GCNT1                                                     |
| 146 | ALHFSEDEI  | 6097                                       | RORC                                                      |
| 147 | YLMDDTVEI  | 114327                                     | EFHC1                                                     |
| 148 | MLAGIAITV  | 63826                                      | SRR                                                       |
| 149 | ILNTHITEL  | 131578                                     | LRRC15                                                    |
| 150 | VLYDRPLKI  | 64783                                      | RBM15                                                     |
| 151 | SVLDSTAKV  | 54885                                      | TBC1D8B                                                   |
| 152 | MMVGDILLEV | 5927                                       | KDM5A                                                     |
| 153 | FISERVEVV  | 128869                                     | PIGU                                                      |
| 154 | RLLGTEFQV  | 51151                                      | SLC45A2                                                   |
| 155 | LLNPVVEFV  | 5591                                       | PRKDC                                                     |
| 156 | ILGDLSHLL  | 11015                                      | KDEL3                                                     |
| 157 | TLTSLLAQA  | 83481                                      | EPPK1                                                     |

Таблица 4: Пептиды в соответствии с настоящим изобретением, связывающиеся с молекулами HLA-A\*24.

| SEQ ID No. | Последовательность | Идент. номер(а) гена                                        | Официальный(ые) символ(ы) гена                                     |
|------------|--------------------|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| 158        | HYSQELSLLYL        | 5591                                                        | PRKDC                                                              |
| 159        | LYNKGFIYL          | 157769                                                      | FAM91A1                                                            |
| 160        | VYTLDIPVL          | 29028                                                       | ATAD2                                                              |
| 161        | IYLVSIPEL          | 23545                                                       | ATP6V0A2                                                           |
| 162        | VFTRVSSFL          | 1511                                                        | CTSG                                                               |
| 163        | DYLKGLASF          | 1130                                                        | LYST                                                               |
| 164        | KFSSFSLFF          | 3003                                                        | GZMK                                                               |
| 165        | DYTTWTALL          | 10615                                                       | SPAG5                                                              |
| 166        | YYVESGKLF          | 23279                                                       | NUP160                                                             |
| 167        | NYINRILKL          | 51691                                                       | NAA38                                                              |
| 168        | KYQDILETI          | 79730                                                       | NSUN7                                                              |
| 169        | AYTLIAPNI          | 94240                                                       | EPSTI1                                                             |
| 170        | VYEDQVGKF          | 23065                                                       | EMC1                                                               |
| 171        | LFIPSSKLLFL        | 101060416, 101060589, 23049, 440345, 440354, 552900, 641298 | LOC101060416, SMG1, BOLA2, 61E3.4, LOC101060589, SMG1P1, LOC440354 |
| 172        | TYTTVPRVAF         | 10882                                                       | C1QL1                                                              |
| 173        | IYSWILDHF          | 3344                                                        | FOXN2                                                              |
| 174        | VYVGGGQIIHL        | 151354                                                      | FAM84A                                                             |
| 175        | YYEVHKELF          | 9055                                                        | PRC1                                                               |
| 176        | EYNQWFTKL          | 55604                                                       | LRRC16A                                                            |
| 177        | VYPWLGALL          | 54905                                                       | CYP2W1                                                             |
| 178        | IFIEVFSHF          | 284293                                                      | HMSD                                                               |
| 179        | MYDSYWRQF          | 143686                                                      | SESN3                                                              |
| 180        | IYDDSFIRPVTf       | 56886                                                       | UGGT1                                                              |
| 181        | LYLDIINLF          | 51643                                                       | TMBIM4                                                             |
| 182        | IYQLDTASI          | 55003                                                       | PAK1IP1                                                            |
| 183        | VFTSTARAF          | 10225                                                       | CD96                                                               |
| 184        | VFQNFPLLF          | 56890                                                       | MDM1                                                               |
| 185        | IYKVGAPTI          | 10978                                                       | CLP1                                                               |
| 186        | IFPQFLYQF          | 23250                                                       | ATP11A                                                             |
| 187        | TYLRDQHFL          | 898                                                         | CCNE1                                                              |
| 188        | RYFKGLVF           | 166614                                                      | DCLK2                                                              |
| 189        | WYVNGVNYF          | 79054                                                       | TRPM8                                                              |
| 190        | GFFIFNERF          | 10206                                                       | TRIM13                                                             |
| 191        | VFKASKITF          | 5803                                                        | PTPRZ1                                                             |
| 192        | SYALLTYMI          | 7298                                                        | TYMS                                                               |

| SEQ ID No. | Последовательность | Идент. номер(а) гена             | Официальный(ые) символ(ы) гена     |
|------------|--------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| 193        | RFHPTPLLL          | 51605                            | TRMT6                              |
| 194        | EFGSLHLEFL         | 57134                            | MAN1C1                             |
| 195        | TYSVSFPMF          | 257202, 2882                     | GPX6, GPX7                         |
| 196        | LYIDRPLPYL         | 253725, 387680, 55747            | FAM21C, FAM21B, FAM21A             |
| 197        | EYSLFPGQVVI        | 23649                            | POLA2                              |
| 198        | LYLDKATLI          | 55916                            | NXT2                               |
| 199        | RYAEEVGIF          | 54187                            | NANS                               |
| 200        | YYGPSLFLL          | 10075                            | HUWE1                              |
| 201        | IYATEAHVF          | 55706                            | TMEM48                             |
| 202        | VYWDSAGAAHF        | 55501                            | CHST12                             |
| 203        | FYSRLLQKF          | 55055                            | ZWILCH                             |
| 204        | TYELRYFQI          | 200916                           | RPL22L1                            |
| 205        | VHIPEVYLI          | 57705                            | WDFY4                              |
| 206        | EYQENFLSF          | 441027                           | TMEM150C                           |
| 207        | AYVVFVSTL          | 25938                            | HEATR5A                            |
| 208        | TYTQDFNKF          | 796                              | CALCA                              |
| 209        | TYKDEGNDYF         | 7268                             | TTC4                               |
| 210        | IYTMIRNLI          | 4193                             | MDM2                               |
| 211        | YYLEVGTKLI         | 80267                            | EDEM3                              |
| 212        | YYTFHFLYF          | 26273                            | FBXO3                              |
| 213        | IFDEAEKL           | 64222                            | TOR3A                              |
| 214        | LYLKLWNLI          | 11274, 373856                    | USP18, USP41                       |
| 215        | YFDKVVTI           | 374654                           | KIF7                               |
| 216        | QYSSVFKSL          | 25938                            | HEATR5A                            |
| 217        | FFPPTRQMGLLF       | 85415                            | RHPN2                              |
| 218        | YYKSTSSAF          | 79690                            | GAL3ST4                            |
| 219        | EYPLVINTL          | 100129460, 23333                 | DPY19L1P1, DPY19L1                 |
| 220        | GYIDNVTLI          | 3918                             | LAMC2                              |
| 221        | RYSTGLAGNLL        | 54921                            | CHTF8                              |
| 222        | TFSVSSHLLF         | 90874                            | ZNF697                             |
| 223        | KYIPYKYVI          | 57674                            | RNF213                             |
| 224        | QYLENLEKL          | 101060589, 23049, 440345, 641298 | 61E3.4, SMG1P1, SMG1, LOC101060589 |
| 225        | YYVYIMNHL          | 10655                            | DMRT2                              |
| 226        | VYRDETGELF         | 84455                            | EFCAB7                             |
| 227        | IFLDYEAGTLSF       | 202658, 56658                    | TRIM39, TRIM39-RPP21               |
| 228        | KYTSWYVAL          | 2247                             | FGF2                               |

Таблица 5: Дополнительные пептиды, связывающиеся с HLA-A\*02, в соответствии с настоящим изобретением, ассоциация которых с раком не была известна ранее.

| SEQ ID No. | Последовательность | Идент. номер(а) гена | Официальный(ые) символ(ы) гена |
|------------|--------------------|----------------------|--------------------------------|
| 229        | AILAHLNTV          | 8914                 | TIMELESS                       |
| 230        | KLQNIMMLL          | 3070                 | HELLS                          |
| 231        | MLDKYSHYL          | 139818               | DOCK11                         |
| 232        | KIFPAALQLV         | 2618                 | GART                           |
| 233        | HLFDAFVSV          | 55789                | DEPDC1B                        |
| 234        | LLSPHPAL           | 10884                | MRPS30                         |
| 235        | KIIDFLSAL          | 2956                 | MSH6                           |
| 236        | STIAILNSV          | 23310                | NCAPD3                         |
| 237        | ALAPHLDDA          | 54919                | HEATR2                         |
| 238        | GLYERPTAA          | 2672                 | GFI1                           |
| 239        | KMNESTRSV          | 4173                 | MCM4                           |
| 240        | YMGECKLIASV        | 23404                | EXOSC2                         |
| 241        | KTIQQLETV          | 55127                | HEATR1                         |
| 242        | WLYGEDHQI          | 586                  | BCAT1                          |
| 243        | FMADDIFSV          | 50615                | IL21R                          |
| 244        | YLLEKNRVV          | 4651                 | MYO10                          |
| 245        | SLLDLPLSL          | 9487                 | PIGL                           |
| 246        | TVSDVLNSV          | 22796                | COG2                           |
| 247        | ALYEGYATV          | 10072, 582           | DPP3, BBS1                     |
| 248        | YLDRFLAGV          | 894                  | CCND2                          |
| 249        | GLCERLVSL          | 5591                 | PRKDC                          |
| 250        | SLAPATPEV          | 9308                 | CD83                           |
| 251        | ALSVLRAL           | 6691                 | SPINK2                         |
| 252        | RLMEICESL          | 1063                 | CENPF                          |
| 253        | ALAEIDNSL          | 23347                | SMCHD1                         |
| 254        | KLQGKLPFL          | 5198                 | PFAS                           |
| 255        | SLLHFTENL          | 157570               | ESCO2                          |
| 256        | SLGEEQFSV          | 157570               | ESCO2                          |
| 257        | GLYTDPCGV          | 55007                | FAM118A                        |
| 258        | LLSERFINV          | 56647                | BCCIP                          |
| 259        | ILLPRIIEA          | 83959                | SLC4A11                        |
| 260        | ILLEKILSL          | 9373                 | PLAA                           |
| 261        | QLQDRVYAL          | 55374                | TMCO6                          |
| 262        | FMVDKAIYL          | 55068                | ENOX1                          |
| 263        | VLLSEQGDVKL        | 10494, 51765, 6788   | STK25, MST4, STK3              |
| 264        | KLFPQETLFL         | 11124                | FAF1                           |
| 265        | NTCPYVHNI          | 51728                | POLR3K                         |

| SEQ ID No. | Последовательность | Идент. номер(а) гена | Официальный(ые) символ(ы) гена |
|------------|--------------------|----------------------|--------------------------------|
| 266        | YAIGLVMRL          | 401494               | PTPLAD2                        |

Таблица 6: Дополнительные пептиды, связывающиеся с HLA-A\*24, в соответствии с настоящим изобретением, ассоциация которых с раком не была известна ранее.

| SEQ ID No. | Последовательность | Идент. номер(а) гена | Официальный(ые) символ(ы) гена |
|------------|--------------------|----------------------|--------------------------------|
| 267        | KYMVYPQTF          | 10884                | MRPS30                         |
| 268        | QYLGQIQHI          | 7298                 | TYMS                           |
| 269        | YFIDSTNLKTHF       | 51042                | ZNF593                         |
| 270        | NYYEVHKELF         | 9055                 | PRC1                           |
| 271        | LYHDIFSRL          | 9603                 | NFE2L3                         |
| 272        | QYLQDAYSF          | 9918                 | NCAPD2                         |
| 273        | TYIKPISKL          | 4644                 | MYO5A                          |
| 274        | AYLHSHALI          | 51347                | TAOK3                          |
| 275        | EYINQGDLEHF        | 4919                 | ROR1                           |
| 276        | VYGFQWRHF          | 7298                 | TYMS                           |
| 277        | VYQGHTALL          | 5754                 | PTK7                           |
| 278        | RYISDQLFTNF        | 23268                | DNMBP                          |
| 279        | TYIESASEL          | 79623                | GALNT14                        |
| 280        | RYPDNLKHLYL        | 29080                | CCDC59                         |
| 281        | PYRLIFEKF          | 5591                 | PRKDC                          |
| 282        | KFVDSTFYL          | 9688                 | NUP93                          |
| 283        | TYGDAGLTYTF        | 121642               | ALKBH2                         |
| 284        | RYLNKAFHI          | 23310                | NCAPD3                         |
| 285        | HYPPVQVLF          | 2956                 | MSH6                           |
| 286        | RYPDNLKHL          | 29080                | CCDC59                         |
| 287        | LYITEPKTI          | 11219, 55559         | TREX2, HAUS7                   |
| 288        | VYVSDIQEL          | 23225, 255330        | NUP210P1, NUP210               |
| 289        | KYPVEWAKF          | 51101                | ZC2HC1A                        |

Таблица 7A: Пептиды, связывающиеся с HLA-A\*02, полезные, например, для персонализированной противораковой терапии.

| SEQ ID No. | Последовательность | Идент. номер(а) гена | Официальный(ые) символ(ы) гена |
|------------|--------------------|----------------------|--------------------------------|
| 290        | KIVDFSYSV          | 701                  | BUB1B                          |
| 291        | KLDETGNL           | 7153                 | TOP2A                          |
| 292        | GMMTAILGV          | 79939                | SLC35E1                        |
| 293        | FLVDGSWSI          | 57642                | COL20A1                        |
| 294        | GLMKYIGEV          | 79054                | TRPM8                          |

Таблица 7Б: Пептиды, связывающиеся с HLA-A\*02, полезные, например, для персонализированной противораковой терапии.

| SEQ ID No. | Последовательность | Идент. номер(а) гена | Официальный(ые) символ(ы) гена |
|------------|--------------------|----------------------|--------------------------------|
| 305        | KLFTSVFGV          | 1791                 | DNTT                           |
| 306        | ALLSSLNEL          | 367                  | AR                             |

Таблица 8: Пептиды, связывающиеся с HLA-A\*24, полезные, например, для персонализированной противораковой терапии.

| SEQ ID No. | Последовательность | Идент. номер(а) гена | Официальный(ые) символ(ы) гена |
|------------|--------------------|----------------------|--------------------------------|
| 295        | YYPGVILGF          | 55026                | TMEM255A                       |
| 296        | TYVDSSHTI          | 1462                 | VCAN                           |
| 297        | PFLQASPHF          | 84985                | FAM83A                         |
| 298        | RYLEGTSCI          | 83481                | EPPK1                          |
| 299        | VYFVAPAKF          | 3918                 | LAMC2                          |
| 300        | AYVLRLETI          | 10687                | PNMA2                          |
| 301        | AYKPGALTF          | 84883                | AIFM2                          |
| 302        | RYMPPAHRNF         | 3620                 | IDO1                           |

Настоящее изобретение также, в основном, относится к пептидам в соответствии с настоящим изобретением для применения в лечении пролиферативных заболеваний, например, глиобластомы (ГБ), рака молочной железы (РМЖ), колоректального рака (КРК), почечноклеточной карциномы (ПКК), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), гепатоклеточной карциномы (ГКК), немелкоклеточного и мелкоклеточного рака легких (НМРЛ, МРЛ), неходжкинской лимфомы (НХЛ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), рака яичника (РЯ), рака поджелудочной железы (РПЖ), рака предстательной железы (РПрЖ), рака пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода (РП), рака желчного пузыря и холангиокарциномы (РЖП, ХК), меланомы (МЕЛ), рака желудка (РЖ), рака мочевого пузыря (РМП), плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПлККГШ) и рака матки (РЭМ).

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: 289, SEQ ID NO:

305 и SEQ ID NO: 306. Особенно предпочтительными являются пептиды – в отдельности или в комбинации – выбранные из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 149 (см. Таблицу 3), SEQ ID NO: 158 по SEQ ID NO: 213 (см. Таблицу 4) и SEQ ID NO: 305 и SEQ ID NO: 306, в частности, состоящей из последовательности, которая выбрана из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 2, 24, 32, 39, 64, 72, 106, 149, 251, 305 и 306 и их применение в иммунотерапии глиобластомы, рака молочной железы, колоректального рака, почечноклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, гепатоклеточной карциномы, немелкоклеточного и мелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, острого миелоидного лейкоза, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода, рака желчного пузыря и холангиокарциномы, меланомы, рака желудка, рака мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПлККГШ) или рака матки.

Как показано в Примере 1, многие из пептидов в соответствии с настоящим изобретением присутствуют в различных других видах опухолей и могут, таким образом, применяться в иммунотерапии при других показаниях. Избыточная экспрессия лежащих в основе полипептидов при различных видах рака, как представлено в Примере 2, предполагает пригодность этих пептидов при различных других онкологических показаниях.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению пептидов в соответствии с настоящим изобретением – предпочтительно в комбинации – в лечении пролиферативного заболевания, выбранного из группы: глиобластомы, рака молочной железы, колоректального рака, почечноклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, гепатоклеточной карциномы, немелкоклеточного и мелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, острого миелоидного лейкоза, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного

перехода, рака желчного пузыря и холангиокарциномы, меланомы, рака желудка, рака мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы головы и шеи или рака матки.

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

Настоящее изобретение далее относится к пептидам в соответствии с настоящим изобретением, где указанные пептиды (каждый из них) состоят или состоят по существу из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 289, SEQ ID NO: 305 и SEQ ID NO: 306.

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 (NK) 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 культивирование 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 изобретением, где антигенпрезентирующая клетка включает вектор экспрессии, способный экспрессировать или экспрессирующий указанный пептид, содержащий последовательность с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 289, предпочтительно содержащий последовательность с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 158 по SEQ ID NO: 213 или вариантную аминокислотную последовательность.

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

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

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

Предпочтительно, если указанное лекарственное средство предназначено 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 глиобластомы, рака молочной железы, колоректального рака, почечноклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, гепатоклеточной карциномы, немелкоклеточного и мелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, острого миелоидного лейкоза, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода, рака желчного пузыря и холангиокарциномы, меланомы, рака желудка, рака мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы головы и шеи или рака матки.

Настоящее изобретение далее относится к биомаркерам на основе пептидов в соответствии с настоящим изобретением, называемым в настоящем контексте «мишени», которые могут применяться в диагностике рака, предпочтительно, глиобластомы, рака молочной железы, колоректального рака, почечноклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, гепатоклеточной карциномы, немелкоклеточного и мелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, острого миелоидного лейкоза, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака

предстательной железы, рака пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода, рака желчного пузыря и холангиокарциномы, меланомы, рака желудка, рака мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы головы и шеи или рака матки. В роли маркера может выступать избыточная презентация самого(их) пептида(ов) или избыточная экспрессия соответствующего(их) гена(ов). Эти маркеры могут также использоваться для предсказания вероятности успеха лечения, предпочтительно иммунотерапии, и, наиболее предпочтительно, иммунотерапии, направленной на ту же мишень, которая была идентифицирована биомаркером. Например, для окрашивания срезов опухоли для выявления присутствия интересующего пептида в комплексе с МНС может использоваться антитело или растворимый ТКР.

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

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

Однонуклеотидный полиморфизм ABCC11, как было показано, ассоциируется с более коротким периодом выживаемости без рецидивов у пациентов с немелкоклеточным раком легких, которые получали адъювантную химиотерапию препаратом S-1 (Tsuchiya et al., 2016). ABCC11 описывали как промотор рака молочной железы с фенотипом мультилекарственной резистентности. Кроме того, высокий уровень экспрессии ABCC11 в опухолях молочной железы, как было продемонстрировано, ассоциируется с агрессивным подтипом и низкой выживаемостью без признаков заболевания (Honorat et al., 2013; Yamada et al., 2013). Уровни транскриптов ABCC11 среди пациентов с колоректальным раком, как было показано, значительно ниже у не отвечающих на паллиативную химиотерапию по сравнению с теми, кто имел ответ на нее, что ассоциировалось с более короткими периодами без признаков заболевания (Hlavata et al., 2012). ABCC11 описывали как потенциальный биомаркер для лечения пеметрекседом

(MTA) при аденокарциномах легких (Uemura et al., 2010). Повышенный уровень ABCC11 при остром миелолейкозе, как было показано, ассоциируется с низкой вероятностью того, что общая выживаемость составит более 4 лет, и может служить в качестве предсказательного маркера (Guo et al., 2009). Уровень ABCC11, как было продемонстрировано, повышен при гепатоклеточной карциноме (Borel et al., 2012).

AR кодирует ген андрогенного рецептора, длина которого более 90 Кб, и белок, имеющий 3 основных функциональных домена: N-терминальный домен, ДНК-связывающий домен и андроген-связывающий домен. Белок действует как фактор транскрипции, активируемый стероидными гормонами. При связывании гормонального лиганда рецептор отделяется от вспомогательных белков, перемещается в ядро, димеризуется и затем стимулирует транскрипцию андроген-чувствительных генов. Этот ген содержит 2 сегмента полиморфных тринуклеотидных повторов, которые кодируют полиглутаминовые и полиглициновые тракты в домене N-терминальной трансактивации его белка. Увеличение нормальной длины полиглутаминового тракта от нормальных 9–34 повторов до патогенного размера 38–62 повторов вызывает спинально-бульбарную мышечную атрофию (болезнь Кеннеди). Мутации этого гена ассоциируются с синдромом полной нечувствительности к андрогенам (CAIS). Сообщалось о двух вариантах альтернативного сплайсинга, кодирующих различные изоформы. В заявке US20150306197 A1 раскрыта последовательность с SEQ ID NO. 305 в качестве пептидного эпитопа LBD (лиганд-связывающий домен) гена AR, который был идентифицирован с помощью сканирования белковой последовательности LBD гена AR относительно 9-мерных или 10-мерных пептидов, которые совпадают с консенсусной HLA-A2-связывающей последовательностью, руководствуясь их предсказанной аффинностью связывания с HLA-A2. Этот пептид был предложен исключительно для вакцины против рака предстательной железы.

C1orf186 кодирует открытую рамку считывания 186 хромосомы 1 и локализован на хромосоме 1q32.1 (RefSeq, 2002). Круппель-подобный фактор 9 ингибирует

экспрессию C1orf186 в клетках эндометриальной карциномы (Simmen et al., 2008). C1orf186 ассоциируется с ЭР-положительным раком молочной железы (Triulzi et al., 2015).

DNTT кодирует ДНК-нуклеотидилэкзотрансферазу. Закодированный белок экспрессируется *in vivo* в ограниченной популяции нормальных и злокачественных пре-В и пре-Т-лимфоцитов на ранних стадиях дифференциации, где он создает разнообразие антигенных рецепторов, синтезируя элементы не зародышевой линии (N-участки) на стыках перегруппированных сегментов генов тяжелой цепи Ig и Т-клеточных рецепторов. Описывали альтернативные сплайс-варианты транскрипта, кодирующие различные изоформы этого гена. В заявке US20110142842 A1 предсказывается, что пептид с последовательностью с SEQ ID NO. 305 будет связываться с HLA-A\*0201 как последовательности белков, специфичных для кроветворных клеток. Пептид не подвергался дальнейшим исследованиям, и в публикации обсуждается возможность лечения многочисленных различных видов рака, включая лейкоз, лимфомы, такие как неходжкинская лимфома, и множественную миелому.

LRRC15 кодирует белок 15, содержащий богатый лейцином повтор, и локализован на хромосоме 3q29 (RefSeq, 2002). EWSR1-WT1 – это онкогенный фактор транскрипции, который, как было показано, влияет на экспрессию LRRC15 (Cliteur et al., 2012; Reynolds et al., 2003). LRRC15 является опухолевым антигеном, избыточно экспрессируемым при ряде заболеваний (O'Prey et al., 2008). LRRC15 ассоциируется с инвазией при раке молочной железы (Schuetz et al., 2006). LRRC15 ассоциируется с агрессивностью поведения андроген-независимых метастатических опухолей предстательной железы (Stanbrough et al., 2006). Аутоантитела к LRRC15 обратно коррелируют с раком молочной железы (Evans et al., 2014).

MAGEC2 кодирует члена C2 семейства MAGE, ген, находящийся в кластере на хромосоме Xq26-q27, подобно другим генам семейства MAGEC (RefSeq, 2002).

Избыточная экспрессия MAGEC2 повышает уровень циклина E и стимулирует переход от G1 к S-фазе и пролиферацию клеток (Hao et al., 2015). MAGEC2 способствует пролиферации и развитию резистентности к апоптозу при множественной миеломе, позволяя предположить, что MAGEC2-специфические средства иммунотерапии располагают потенциалом для уничтожения наиболее злокачественных клеток (Lajmi et al., 2015). MAGEC2, индуктор эпителиально-мезенхимального перехода, ассоциируется с метастазами при раке молочной железы. Многомерные анализы показали, что экспрессия MAGEC2 была независимым фактором риска для общей выживаемости пациента и выживаемости без метастазирования (Yang et al., 2014).

MET кодирует рецептор фактора роста гепатоцитов и тирозинкиназную активность (RefSeq, 2002). Как было продемонстрировано, уровень MET повышен при дедифференцированной липосаркоме и ассоциируется с меланоцитарными опухолями, гепатоклеточной карциномой, немелкоклеточным раком легких, наследственными видами папиллярного рака почки и аденокарциномами желудка (Petrini, 2015; Finocchiaro et al., 2015; Steinway et al., 2015; Bill et al., 2015; Yeh et al., 2015).

PRAME кодирует антиген, который преимущественно экспрессируется в меланомах человека и функционирует как репрессор рецептора ретиноевой кислоты, скорее всего, создавая благоприятные условия для роста раковых клеток за счет этой функции (RefSeq, 2002). Уровень PRAME, как было показано, повышен в клеточных линиях множественной миеломы, светлоклеточной почечноклеточной карциномы, рака молочной железы, острого миелолейкоза, меланомы, хронического миелолейкоза, плоскоклеточной карциномы головы и шеи и остеосаркомы (Dannenmann et al., 2013; Yao et al., 2014; Zou et al., 2012; Szczepanski and Whiteside, 2013; Zhang et al., 2013; Beard et al., 2013; Abdelmalak et al., 2014; Qin et al., 2014). PRAME ассоциируется с миксоидной и круглоклеточной липосаркомой (Hemminger et al., 2014). PRAME ассоциируется с более коротким периодом выживаемости без прогрессирования заболевания и ответом на химиотерапию при диффузной

крупноклеточной В-клеточной лимфоме с режимом лечения R-CHOP, с маркерами неблагоприятного прогноза при плоскоклеточной карциноме головы и шеи, плохим ответом на химиотерапию при уротелиальной карциноме и неблагоприятным прогнозом и метастазами в легкие при остеосаркоме (Tan et al., 2012; Dyrskjot et al., 2012; Szczepanski et al., 2013; Mitsuhashi et al., 2014). PRAME ассоциируется с более низким уровнем рецидивов, смертности и общей выживаемостью при остром лимфобластном лейкозе (Abdelmalak et al., 2014). PRAME может быть прогностическим маркером диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы при лечении по схеме R-CHOP (Mitsuhashi et al., 2014).

SPINK2 кодирует члена семейства ингибиторов серинпротеаз типа Kazal, который выступает в роли ингибитора трипсина и акрозина в половых путях и локализован в сперматозоидах (RefSeq, 2002). Как было продемонстрировано, уровень SPINK2 существенно повышен в большинстве линий клеток лейкоза за исключением клеток ТК-6 В-лимфобластов, и предполагается, что он играет важную роль в прогрессировании опухоли и ответе на терапию (Chen et al., 2009).

STEAP2 кодирует металлоредуктазу типа STEAP2, которая кодирует многопроходный мембранный белок, локализованный в комплексе Гольджи, плазматической мембране и тубулярно-везикулярных структурах в цитозоле. Повышенная транскрипционная экспрессия этого человеческого гена ассоциируется с прогрессированием рака предстательной железы (RefSeq, 2002). STEAP2 индуцируется воздействием TNF-альфа и подавляется – NF-каппаВ. Ингибирование NF-каппаВ приводит к избыточной экспрессии антиапоптотического белка STEAP2, который затем подавляет p53 (Gonen-Korkmaz et al., 2014). STEAP2 экспрессируется в избытке при многих видах рака, например, при раке предстательной железы, мочевого пузыря, толстой кишки, поджелудочной железы, яичника, яичка, молочной железы, шейки матки и саркоме Юинга (Wang et al., 2010; Gomes et al., 2012; Grunewald et al., 2012). STEAP2 может активировать миграцию и инвазию клеток рака предстательной железы. Избыточная экспрессия STEAP2 ассоциируется с локально-распространенной формой заболевания (Whiteland et al.,

2014). STEAP2 обладает большей долей несплайсированной РНК при кастрационно-резистентном раке предстательной железы (Sowalsky et al., 2015). STEAP2 может быть использован в качестве биомаркера рака предстательной железы (Edwards et al., 2005). STEAP2 ассоциируется с резистентностью к симвастину и ловастатину (Savas et al., 2011).

UMODL1 кодирует белок 1, подобный уромодулину, и локализован на хромосоме 21q22.3 (RefSeq, 2002). UMODL1 может активировать процесс метастазирования при аденокарциноме легких (Tan et al., 2016). Химерная длинная некодирующая РНК, UMODL1-AS1, может быть использована как прогностический фактор в отношении рецидивирования рака молочной железы (Liu et al., 2016).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Таблица 9: 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%                                 |
| DR2    | Афроамериканцы (Северная Америка)    | 29,80%                                 |

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

| Аллель | Популяция     | Рассчитанный фенотип по частоте аллеля |
|--------|---------------|----------------------------------------|
| 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 или A\*24. 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 или A\*24-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%.

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: 289 или ее вариант, который на 88% гомологичен последовательностям с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 289, 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: 289. 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: 289, 305 и 306, 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 другие аминокислоты, включение которых существенно не влияет на реактивность Т-клетки и не устраняет связывание с соответствующим МНС. Таким образом, помимо данного условия, пептид по изобретению может быть любым пептидом (в этот термин авторы изобретения включают олигопептиды или полипептиды), который включает аминокислотные последовательности или их участок или их вариант, как дано.

Таблица 10: Варианты и мотив пептидов, связывающихся с HLA-A\*02, в соответствии с SEQ ID NO: 1, 2 и 3.

| Позиция      | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|--------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| SEQ ID NO. 1 | L | L | Y | P | E | P | W | S | V |    |
| Вариант      |   |   |   |   |   |   |   |   | I |    |
|              |   |   |   |   |   |   |   |   | L |    |
|              |   |   |   |   |   |   |   |   | A |    |
|              |   | M |   |   |   |   |   |   |   |    |
|              |   | M |   |   |   |   |   |   | I |    |
|              |   | M |   |   |   |   |   |   | L |    |
|              |   | M |   |   |   |   |   |   | A |    |
|              |   | A |   |   |   |   |   |   |   |    |
|              |   | A |   |   |   |   |   |   | I |    |
|              |   | A |   |   |   |   |   |   | L |    |
|              |   | A |   |   |   |   |   |   | A |    |
|              |   | V |   |   |   |   |   |   |   |    |
|              |   | V |   |   |   |   |   |   | I |    |
|              |   | V |   |   |   |   |   |   | L |    |
|              |   | V |   |   |   |   |   |   | A |    |
|              |   | T |   |   |   |   |   |   |   |    |
|              |   | T |   |   |   |   |   |   | I |    |
|              |   | T |   |   |   |   |   |   | L |    |
|              |   | T |   |   |   |   |   |   | A |    |
|              |   | Q |   |   |   |   |   |   |   |    |
|              |   | Q |   |   |   |   |   |   | I |    |
|              |   | Q |   |   |   |   |   |   | L |    |
|              |   | Q |   |   |   |   |   |   | A |    |
| Позиция      | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |

|                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |
|-----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| SEQ ID NO.<br>2 | G | L | I | A | G | V | V | S | I |    |
| Вариант         |   |   |   |   |   |   |   |   | V |    |
|                 |   |   |   |   |   |   |   |   | L |    |
|                 |   |   |   |   |   |   |   |   | A |    |
|                 |   | M |   |   |   |   |   |   | V |    |
|                 |   | M |   |   |   |   |   |   |   |    |
|                 |   | M |   |   |   |   |   |   | L |    |
|                 |   | M |   |   |   |   |   |   | A |    |
|                 |   | A |   |   |   |   |   |   | V |    |
|                 |   | A |   |   |   |   |   |   |   |    |
|                 |   | A |   |   |   |   |   |   | L |    |
|                 |   | A |   |   |   |   |   |   | A |    |
|                 |   | V |   |   |   |   |   |   | V |    |
|                 |   | V |   |   |   |   |   |   |   |    |
|                 |   | V |   |   |   |   |   |   | L |    |
|                 |   | V |   |   |   |   |   |   | A |    |
|                 |   | T |   |   |   |   |   |   | V |    |
|                 |   | T |   |   |   |   |   |   |   |    |
|                 |   | T |   |   |   |   |   |   | L |    |
|                 |   | T |   |   |   |   |   |   | A |    |
|                 |   | Q |   |   |   |   |   |   | V |    |
|                 |   | Q |   |   |   |   |   |   |   |    |
|                 |   | Q |   |   |   |   |   |   | L |    |
|                 |   | Q |   |   |   |   |   |   | A |    |
| Позиция         | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| SEQ ID NO.<br>3 | K | L | E | E | N | G | D | L | Y | L  |
| Вариант         |   |   |   |   |   |   |   |   |   | V  |
|                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   | I  |
|                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   | A  |
|                 |   | M |   |   |   |   |   |   |   | V  |
|                 |   | M |   |   |   |   |   |   |   | I  |
|                 |   | M |   |   |   |   |   |   |   |    |
|                 |   | M |   |   |   |   |   |   |   | A  |
|                 |   | A |   |   |   |   |   |   |   | V  |
|                 |   | A |   |   |   |   |   |   |   | I  |
|                 |   | A |   |   |   |   |   |   |   |    |
|                 |   | A |   |   |   |   |   |   |   | A  |
|                 |   | V |   |   |   |   |   |   |   | V  |
|                 |   | V |   |   |   |   |   |   |   | I  |
|                 |   | V |   |   |   |   |   |   |   |    |

|  |   |  |  |  |  |  |  |  |   |
|--|---|--|--|--|--|--|--|--|---|
|  | V |  |  |  |  |  |  |  | A |
|  | T |  |  |  |  |  |  |  | V |
|  | T |  |  |  |  |  |  |  | I |
|  | T |  |  |  |  |  |  |  |   |
|  | T |  |  |  |  |  |  |  | A |
|  | Q |  |  |  |  |  |  |  | V |
|  | Q |  |  |  |  |  |  |  | I |
|  | Q |  |  |  |  |  |  |  |   |
|  | Q |  |  |  |  |  |  |  | A |

Таблица 11: Варианты и мотив пептидов, связывающихся с HLA-A\*24, в соответствии с SEQ ID NO: 158, 159 и 160.

| Позиция        | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|
| SEQ ID NO. 158 | H | Y | S | Q | E | L | S | L | L | Y  | L  |
| Вариант        |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    | I  |
|                |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    | F  |
|                |   | F |   |   |   |   |   |   |   |    | I  |
|                |   | F |   |   |   |   |   |   |   |    |    |
|                |   | F |   |   |   |   |   |   |   |    | F  |
| Позиция        | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| SEQ ID NO. 159 | L | Y | N | K | G | F | I | Y | L |    |    |
| Вариант        |   |   |   |   |   |   |   |   | I |    |    |
|                |   |   |   |   |   |   |   |   | F |    |    |
|                |   | F |   |   |   |   |   |   | I |    |    |
|                |   | F |   |   |   |   |   |   |   |    |    |
|                |   | F |   |   |   |   |   |   | F |    |    |
| Позиция        | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| SEQ ID NO. 160 | V | Y | T | L | D | I | P | V | L |    |    |
| Вариант        |   |   |   |   |   |   |   |   | I |    |    |
|                |   |   |   |   |   |   |   |   | F |    |    |
|                |   | F |   |   |   |   |   |   | I |    |    |
|                |   | F |   |   |   |   |   |   |   |    |    |
|                |   | F |   |   |   |   |   |   | F |    |    |

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 12.

Таблица 12: Комбинации элонгаций пептидов по изобретению

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

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

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

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

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

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

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

В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения пептид состоит или по существу состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 289, 305 и 306.

«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: 289, 305 и 306 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 (p33, в дальнейшем «Ii») HLA-DR, как взятый из банка данных NCBI, инвентарный номер - GenBank Accession-number X00497. В других видах слияния пептиды по настоящему изобретению могут быть слиты с антителом, описанным в настоящем документе, или его функциональной частью, в частности встроены в последовательность антитела, так чтобы быть специфической мишенью указанного антитела, или, например, слиты 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, -CH<sub>2</sub>-NH-, -CH<sub>2</sub>S-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH=CH-, -COCH<sub>2</sub>-, -CH(OH)CH<sub>2</sub>- и -CH<sub>2</sub>SO-. В патенте США № 4 897 445 предлагается метод твердофазного синтеза непептидных связей (-CH<sub>2</sub>-NH) в полипептидных цепях, который включает полипептиды, синтезированные с использованием стандартной методики, и непептидную связь, синтезированную при реакции аминокальдегида и аминокислоты в присутствии NaCNBH<sub>3</sub>.

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 глютаминовой кислоты. N-(3-(диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимид может использоваться для образования внутримолекулярных поперечных связей между остатком лизина и остатком глютаминовой 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 глutarальдегидом, 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: 289, SEQ ID NO: 305 и SEQ ID NO: 306 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  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{SCN}^-$  и в качестве катионов  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Ba}^{2+}$ . В частности, соли выбраны из  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_4\text{Br}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{ClO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{I}$ ,  $\text{NH}_4\text{SCN}$ ,  $\text{Rb}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{Rb}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{RbH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Rb}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Rb}_4\text{CH}_3\text{COO}$ ,  $\text{Rb}_4\text{Cl}$ ,  $\text{Rb}_4\text{Br}$ ,  $\text{Rb}_4\text{NO}_3$ ,

Rb<sub>4</sub>ClO<sub>4</sub>, Rb<sub>4</sub>I, Rb<sub>4</sub>SCN, K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KCH<sub>3</sub>COO, KCl, KBr, KNO<sub>3</sub>, KClO<sub>4</sub>, KI, KSCN, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaCH<sub>3</sub>COO, NaCl, NaBr, NaNO<sub>3</sub>, NaClO<sub>4</sub>, NaI, NaSCN, ZnCl<sub>2</sub> Cs<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, Cs<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, CsH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Cs<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CsCH<sub>3</sub>COO, CsCl, CsBr, CsNO<sub>3</sub>, CsClO<sub>4</sub>, CsI, CsSCN, Li<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, Li<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, LiH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, LiCH<sub>3</sub>COO, LiCl, LiBr, LiNO<sub>3</sub>, LiClO<sub>4</sub>, LiI, LiSCN, Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Mg<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, Mg<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Mg(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MgBr<sub>2</sub>, Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Mg(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, MgI<sub>2</sub>, Mg(SCN)<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, Ca<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, CaSO<sub>4</sub>, Ca(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, CaBr<sub>2</sub>, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Ca(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, CaI<sub>2</sub>, Ca(SCN)<sub>2</sub>, Ba<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, Ba<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Ba(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, BaSO<sub>4</sub>, Ba(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, BaCl<sub>2</sub>, BaBr<sub>2</sub>, Ba(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Ba(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, BaI<sub>2</sub> и Ba(SCN)<sub>2</sub>. Особенно предпочтительными являются ацетат NH, MgCl<sub>2</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KCl, NaCl и CaCl<sub>2</sub>, 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 C-терминальными остатками, для защиты амидогруппы боковой цепи используется 4,4'-диметоксибензгидрильная группа. Твердофазный носитель основан на полимере полидиметилакриламиде, состоящем из трех мономеров: диметилакриламида (каркасный мономер), бис-акрилоилэтилендиамин (компонент для перекрестной сшивки, линкер) и метилового эфира акрилоилсаркозина (функционализирующий агент). Для образования

легкорасщепляемой связи пептида и смолы используется нестойкое к действию кислот производное 4-гидроксиметилфеноксиуксусной кислоты. Все аминокислотные производные добавляются в виде предварительно синтезированных симметричных ангидридных производных за исключением аспарагина и глутамина, которые добавляются с применением обратной реакции соединения, опосредованной N, N-дициклогексилкарбодиимид/1-гидроксibenзотриазолом. Все реакции сочетания и снятия защитных групп отслеживались с помощью методов контроля с применением нингидрина, тринитробензолсульфоновой кислоты или изотина. После завершения синтеза пептиды отщепляются от смолы-носителя с сопутствующим удалением защитных групп боковой цепи при обработке 95% трифторуксусной кислотой, содержащей 50 % смеси поглотителей. Обычно используемые поглотители включают этандитиол, фенол, анизол и воду, окончательный выбор зависит от составляющих аминокислот синтезируемого пептида. Также возможна комбинация твердофазных и жидкофазных методов синтеза пептидов (см., например, (Bruckdorfer et al., 2004), и прилагаемые ссылки).

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

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

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

В целях идентификации пептидов по настоящему изобретению было проведено сравнение данных по экспрессии РНК двух банков данных: данных о последовательностях РНК (RNASeq) опухолей, полученных в исследовательской сети TCGA (Атлас ракового генома) (<http://cancergenome.nih.gov/>) и данных RNASeq (GTEx), охватывающего приibl. 3000 образцов нормальных (здоровых) тканей (Lonsdale, 2013). Проводили скрининг генов со сравнением генов, избыточно экспрессируемых в образцах опухолевых тканей, с нормальными (здоровыми) образцами тканей. Затем, с помощью масс-спектрометрического анализа с использованием платформы XPRESIDENT™, описанной в настоящей заявке, были идентифицированы раково-ассоциированные пептиды, образованные из белковых продуктов данных генов.

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 (N = 450 A\*02-положительных образцов, N = 211 A\*24-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 A\*02 и/или A\*24-положительных пациентов, больных раком.

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

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

Комплексы HLA-пептид из образцов ткани были очищены, и HLA-ассоциированные пептиды были выделены и проанализированы методом ЖХ/МС (см. примеры). Все пептиды TUMAP, содержащиеся в настоящей заявке, были идентифицированы с помощью данного подхода на образцах первичного рака, подтверждая их презентацию на первичных опухолях: глиобластоме, раке молочной железы, колоректальном раке, почечноклеточной карциноме, хроническом лимфоцитарном лейкозе, гепатоклеточной карциноме, немелкоклеточном и мелкоклеточном раке легких, неходжкинской лимфоме, остром миелолейкозе, раке яичника, раке поджелудочной железы, раке предстательной железы, раке пищевода, в том числе раке пищеводно-желудочного перехода, раке желчного пузыря и холангиокарциноме, меланоме, раке желудка, раке мочевого пузыря или раке матки.

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

Кроме того, технологическая платформа XPRESIDENT® v2.1 позволяет проведение прямого абсолютного количественного определения уровня МНС-, предпочтительно HLA-рестриктированного, пептида на раковых или других инфицированных тканях. Вкратце, общее число клеток было подсчитано из общего содержания ДНК проанализированного образца ткани. Общее количество пептида TUMAP в образце ткани измеряли с помощью наноЖХ-МС/МС в виде соотношения природного пептида TUMAP и известного количества версии пептида TUMAP с изотопной меткой, так называемого внутреннего стандарта. Эффективность выделения пептида TUMAP определяли методом введения стандартной добавки комплекса пептид-МНС всех выбранных пептидов TUMAP в лизат ткани в самый ранний возможный момент процесса выделения пептида TUMAP и их обнаружением с помощью наноЖХ-МС/МС, за чем следовало завершение процедуры выделения пептида. Общее число клеток и общее количество пептида были подсчитаны по трем повторным измерениям на образец ткани. Пептид-специфическую эффективность выделения подсчитывали как средний показатель из 10 экспериментов с введением стандартных добавок с тремя повторными измерениями для каждого (см. Пример 6 и Таблицу 22).

Данный комбинированный метод анализа экспрессии РНК и данные спектрометрического анализа позволили выбрать 289 пептидов настоящего изобретения.

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, полезные в лечении раковых заболеваний/опухолей, предпочтительно глиобластомы, рака молочной железы, колоректального рака, почечноклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, гепатоклеточной карциномы, немелкоклеточного и мелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, острого миелолейкоза, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода, рака желчного пузыря и холангиокарциномы, меланомы, рака желудка, рака мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы головы и шеи и рака матки, которые в избытке или исключительно презентируют пептиды по изобретению. Как показал масс-спектрометрический анализ, эти пептиды естественно презентировались молекулами HLA на образцах первичного рака человека.

Многие из исходных генов/белков (называемых также «полноразмерными белками» 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 или ткани, образовавшиеся в том же органе, что и опухоль, или другие нормальные клетки ткани, демонстрирующие высокую степень ассоциации исходных генов с опухолью (см. Пример 2). Более того, сами пептиды в высшей степени избыточно презентируются на опухолевой ткани – понятие «опухолевая ткань» в связи с настоящим изобретением подразумевает образец ткани пациента, страдающего раком, но не на нормальных тканях (см. Пример 1).

Связанные с HLA пептиды могут распознаваться иммунной системой, конкретно Т-лимфоцитами. Т-клетки могут уничтожать клетки, презентирующие распознанные комплексы молекулы HLA с пептидом, например, клетки глиобластомы, рака молочной железы, колоректального рака, почечноклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, гепатоклеточной карциномы,

немелкоклеточного и мелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, острого миелолейкоза, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода, рака желчного пузыря и холангиокарциномы, меланомы, рака желудка, рака мочевого пузыря или рака матки, презентирующие полученные пептиды.

Было показано, что пептиды по настоящему изобретению способны стимулировать Т-клеточные ответы и/или избыточно презентируются и, поэтому, могут использоваться для получения антител и/или ТКР, такие как растворимые ТКР, в соответствии с настоящим изобретением (см. Пример 3). Кроме того, пептиды, если находятся в комплексе с соответствующей молекулой МНС, могут быть использованы для получения антител и/или ТКР, в частности растворимых ТКР, в соответствии с настоящим изобретением. Соответствующие способы хорошо известны специалисту данной области, а также могут быть найдены в соответствующих литературных источниках (см. также ниже). Таким образом, пептиды по настоящему изобретению пригодны для генерирования иммунного ответа в организме пациента для уничтожения опухолевых клеток. Иммунный ответ у пациента может быть индуцирован при непосредственном введении описанных пептидов или подходящих веществ-предшественников (к примеру, удлиненных пептидов, белков или нуклеиновых кислот, кодирующих эти пептиды) пациенту, в идеальном случае в комбинации с веществом, усиливающим иммуногенность (т. е. 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. В данном контексте особенно предпочтительными являются пептиды по изобретению, выбранные из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 2, 24, 32, 39, 64, 72, 106, 149, 251, 305 и 306.

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. Опять же, особенно предпочтительными в данном контексте являются пептиды, выбранные из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 2, 24, 32, 39, 64, 72, 106, 149, 251, 305 и 306.

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, при чем способ включает культивирование 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

вариабельные и константные домены. Вариабельный домен состоит из последовательно расположенных вариабельного сегмента (V) и соединительного сегмента (J). Вариабельный 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<sup>+</sup> Т-клетки, полученные у здоровых доноров, в целях повторной экспрессии альфа- и/или бета-цепей опухолеспецифических ТКР.

Для увеличения уровня экспрессии нуклеиновые кислоты, кодирующие ТКР согласно настоящему описанию, могут быть функционально связаны с сильными

промоторами, такими как длинные терминальные повторы ретровируса (LTR), цитомегаловируса (CMV), вируса стволовых клеток мыши (MSCV) U3, фосфоглицерат-киназой (PGK),  $\beta$ -актином, убиквитином и комбинированным промотором вируса обезьян 40 (SV40)/CD43, фактором элонгации (EF)-1a и промотором вируса некроза селезёнки (SFFV). В предпочтительном варианте осуществления промотор является гетерологичным по отношению к экспрессируемой нуклеиновой кислоте.

В дополнение к сильным промоторам экспрессионные кассеты ТКР согласно настоящему описанию могут содержать дополнительные элементы, которые могут усиливать экспрессию трансгена, включая центральный полипуриновый тракт (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

вариабельных доменов цепей ТКР-альфа и ТКР-бета непосредственно в CD3 $\zeta$  (слияние CD3 $\zeta$ ) (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<sub>2</sub>) 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-толуолсульфокилоту, 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 лекарственное средство по настоящему изобретению является иммунотерапевтическим препаратом, таким как вакцина. Она может вводиться непосредственно пациенту, в пораженный орган или системно в/к, в/м, п/к, в/б и в/в или вноситься *ex vivo* в клетки, полученные от пациента, или в человеческую клеточную линию, которые затем могут вводиться пациенту или использоваться *in vitro* для селекции субпопуляции из иммунных клеток, полученных от пациента, которые после этого вновь вводятся пациенту. Если нуклеиновая кислота введена в клетки *in vitro*, то может быть полезно, чтобы клетки были трансфицированными, чтобы совместно экспрессировать иммуностимулирующие цитокины, такие как интерлейкин-2. Пептид может быть по существу чистым или в комбинации с иммуностимулирующим адъювантом (см. ниже) или использоваться в комбинации с иммуностимулирующими цитокинами или же вводиться с подходящей системой доставки, например, липосомами. Пептид может быть также конъюгирован с подходящим носителем, таким как гемоцианин фиссуреллы (KLH) или маннан (см. WO 95/18145 и (Longenecker et al., 1993)). Пептид может быть также меченым или может быть слитым белком или гибридной молекулой. Пептиды, последовательность которых дана в настоящем

изобретении, как ожидается, стимулируют CD4+ или CD8+ Т-клетки. Тем не менее, стимуляция CD8 Т-клеток более эффективна в присутствии поддержки, предоставляемой CD4 хелперными Т-клетками. Таким образом, для эпитопов МНС I класса, которые стимулируют CD8 Т-клетки, партнеры в слиянии или участки гибридной молекулы надлежащим образом предоставляют эпитопы, которые стимулируют CD4-положительные Т-клетки. CD4- и CD8-стимулирующие эпитопы хорошо известны из уровня техники и включают те, что были идентифицированы в настоящем изобретении.

В одном аспекте вакцина включает по меньшей мере один пептид, имеющий аминокислотную последовательность с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 289, 305 и 306, 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 плаزمид, с соответствующей ориентацией и правильной рамкой считывания для экспрессии. Если необходимо, то ДНК может быть соединена с соответствующими нуклеотидными последовательностями, обеспечивающими координацию транскрипции и трансляции, распознаваемыми желательным хозяином, хотя такие контрольные элементы обычно имеются в векторе экспрессии. Вектор вводится затем хозяину стандартными способами. Как правило, не все хозяева трансформируются вектором. Поэтому будет необходимо выделить трансформированные клетки-хозяева. Одна из методик отбора включает введение в вектор экспрессии последовательности ДНК с любыми необходимыми элементами контроля, которая кодирует выбранный признак в трансформированной клетке, такой как устойчивость к антибиотикам.

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

Клетки-хозяева, которые были трансформированы рекомбинантной ДНК по изобретению, культивируют затем в течение достаточного времени и при соответствующих условиях, известных специалистам данной области, с учетом

раскрытых в данном описании идей, что ведет к экспрессии полипептида, который после этого может быть выделен.

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

Типичная клеточная векторная плазмида млекопитающих для конститутивной экспрессии включает промотор CMV или SV40 с подходящим концевым участком поли-А и маркером устойчивости, таким как неомицин. Одним примером является pSVL, имеющимся в наличии в компании Pharmacia, Пискатеуэй, Нью-Джерси, США. Примером индуцируемого вектора экспрессии млекопитающих является pMSG, также имеющийся в наличии в Pharmacia. Пригодными плазмидными векторами дрожжей являются pRS403-406 и pRS413-416, и они, как правило, имеются в наличии у компании Stratagene Cloning Systems, Ла 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 загружать 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 культивирование 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, внутривнутрибрюшинного (в/б) введения, внутримышечного (в/м) введения. Предпочтительные способы введения пептидов включают п/к, в/к, в/б, в/м и в/в. Предпочтительные способы введения ДНК включают в/к, в/м, п/к, в/б и в/в. Вводятся могут, к примеру, дозы от 50 мкг до 1,5 мг, предпочтительно от 125 мкг до 500 мкг пептида или ДНК, в зависимости от соответствующего пептида или ДНК. Дозировка в данном диапазоне успешно использовалась в предыдущих клинических исследованиях (Walter et al., 2012).

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

Лекарственное средство 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 лекарственном средстве по настоящему изобретению. Подходящие адъюванты включают, но без ограничения, 1018 ISS, соли алюминия, AMPLIVAX®, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, флагеллин или лиганды TLR5, полученные из флагеллина, лиганд FLT3, ГМ-КСФ, IC30, IC31, имиквимод (ALDARA®), резимиквимод, ImuFact IMP321, интерлейкины, такие как ИЛ-2, ИЛ-13, ИЛ-21, интерферон-альфа или бета или их пегилированные производные, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, иммуностимулирующие комплексы ISCOM, JuvImmune®, LipoVac, MALP2, MF59, монофосфорил липид А, Монтанид IMS 1312, Монтанид ISA 206, Монтанид ISA 50V, Монтанид ISA-51, эмульсии «вода в масле» и «масло в воде», ОК-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, векторную систему PepTel®, основанные на поли-(лактид когликолиде) [PLG] и декстрани микрочастицы, талактоферрин SRL172, виросомы 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- $\alpha$ ), ускоряя созревание дендритных клеток до эффективных, презентующих антиген Т-лимфоцитам, клеток (например, ГМ-КСФ, ИЛ-1 и ИЛ-4) (патент США № 5 849 589, специально включенный сюда в полном объеме путем ссылки) и действуя как иммуноадъюванты (например, ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-23, ИЛ-7, ИНФ-альфа, ИНФ-бета) (Gabrilovich et al., 1996).

Об иммуностимулирующих олигонуклеотидах CpG также сообщалось, что они усиливают эффекты адъювантов в составе вакцин. Не желая быть связанными соответствием какой-либо конкретной теории, авторы полагают, что CpG-олигонуклеотиды при активации врожденной (не приобретенной) иммунной системы действуют с помощью Toll-подобных рецепторов (TLR), в основном, TLR9. Вызванная CpG активация TLR9 усиливает антиген-специфичные гуморальные и клеточные ответы на широкий спектр антигенов, включая пептидные или белковые антигены, живые или убитые вирусы, вакцины из дендритных клеток, аутологичные клеточные вакцины и полисахаридные конъюгаты как в профилактических, так и терапевтических вакцинах. Более важно то, что улучшается созревание и дифференциация дендритных клеток, приводя к повышенной активации клеток типа TH1 и интенсивной выработке цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) даже при отсутствии помощи со стороны CD4 Т-клеток. Активация TH1, вызванная стимуляцией TLR9, сохраняется даже в присутствии вакцинных адъювантов, таких как квасцы или неполный адъювант Фрейнда (IFA), которые обычно способствуют активации TH2. CpG-олигонуклеотиды проявляют даже бóльшую адъювантную активность, если они входят в состав или вводятся в организм вместе с другими адъювантами или в таких составах как микрочастицы, наночастицы, липидные эмульсии или в подобных составах, которые в особенности необходимы для инициации сильного ответа, если антиген относительно слаб. Они также ускоряют иммунную реакцию и позволяют снизить дозы антигена приблизительно на два порядка в сравнении с ответами антитела на полную дозу вакцины без CpG, что наблюдалось в некоторых экспериментах (Krieg, 2006). В патенте США № 6 406 705 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, TGFбета, рецептору TNFальфа) и SC58175, которые могут действовать терапевтически и/или как адъюванты. Количества и концентрации адъювантов и добавок, пригодных для использования в контексте настоящего изобретения, могут быть легко определены опытным специалистом без проведения излишних экспериментов.

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

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

В предпочтительном варианте осуществления фармацевтической композиции в соответствии с изобретением адъювант выбран из группы, состоящей из

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

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

Важно понимать, что иммунный ответ, вызванный вакциной в соответствии с изобретением, направлен на раковые клетки на различных стадиях клеточного цикла и различных стадиях развития опухоли. Кроме того, атака направлена на различные сигнальные пути, ассоциированные с раковым заболеванием. Это является преимуществом в сравнении с вакцинами, направленными только на одну или немногие мишени, что может привести к тому, что опухоль легко приспособится к такой атаке (ускользание опухоли). Кроме того, не все отдельные опухоли имеют одинаковые паттерны экспрессии антигенов. Поэтому комбинация нескольких

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

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

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

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

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

Для получения 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 289, 305 и 306 в соответствии с представленным изобретением с молекулой МНС, используя метод cell-SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment - систематическая эволюция лигандов при экспоненциальном обогащении).

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

Таким образом, в другом аспекте изобретения предложен способ получения рекомбинантного антитела, специфически связывающегося с главным комплексом гистосовместимости человека (МНС) I или II класса в комплексе с рестриктированным по HLA антигеном (предпочтительно пептидом в соответствии

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

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

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

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

Настоящее изобретение относится к пептиду, включающему последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 289, 305 и 306 или их вариант, который по меньшей мере на 88% гомологичен (предпочтительно, если он идентичен) последовательности с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 289, 305 и 306, или их варианту, который индуцирует перекрестную реакцию Т-клеток с указанным пептидом, где указанный пептид не является базовым полноразмерным полипептидом.

Настоящее изобретение далее относится к пептиду, включающему последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 289, 305 и 306 или их вариант, который по меньшей мере на 88% гомологичен (предпочтительно, если он идентичен) SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 289, 305 и 306, 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: 289, 305 и 306.

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, нуклеиновой кислоте в соответствии с настоящим изобретением или вектору экспрессии в соответствии с настоящим изобретением для применения в медицине, в частности в лечении раковых заболеваний, например, глиобластомы, рака молочной железы, колоректального рака, почечноклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, гепатоклеточной карциномы, немелкоклеточного и мелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, острого миелолейкоза, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода, рака желчного пузыря и холангиокарциномы, меланомы, рака желудка, рака мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы головы и шеи или рака матки.

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

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

Настоящее изобретение далее относится к способу получения пептида в соответствии с настоящим изобретением, причем указанный способ включает культивирование 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: 289, 305 и 306 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 лекарственного средства или в производстве лекарственного средства. Настоящее изобретение далее относится к способу применения в соответствии с настоящим изобретением, где лекарственное средство проявляет противораковую активность.

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

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

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

Понятие «антитело» или «антитела» используется в контексте данного изобретения в широком смысле и включает как поликлональные, так и моноклональные антитела. В дополнение к интактным или «полноразмерным» 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 глиобластомы, рака молочной железы, колоректального рака, почечноклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, гепатоклеточной карциномы, немелкоклеточного и мелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, острого миелолейкоза, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака пищевода, в том числе рака пищевода-желудочного перехода, рака желчного пузыря и холангиокарциномы, меланомы, рака желудка, рака мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы головы и шеи или рака матки, доставляют токсин к клетке рака, экспрессирующей раковый ген-маркер на повышенном уровне и/или

ингибируют активность полипептидного маркера рака) 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 глиобластомы, рака молочной железы, колоректального рака, почечноклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, гепатоклеточной карциномы, немелкоклеточного и мелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, острого миелолейкоза, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода, рака желчного пузыря и холангиокарциномы, меланомы, рака желудка, рака мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы головы и шеи или рака матки полной длины, так и их фрагменты. Полипептид, необходимый для получения антитела по изобретению, может быть частично или полностью очищенным из природного источника или же может быть получен с использованием методики рекомбинантной ДНК.

Например, кДНК, кодирующая пептид в соответствии с настоящим изобретением, такой как пептид с последовательностью с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 289, 305 и 306, 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 упомянутых выше видов рака, использованным для получения антитела в соответствии с изобретением.

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')<sub>2</sub> 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 интратуморальными или перитуморальными способами, чтобы вызвать местные, а также и системные терапевтические эффекты. Предпочтительными являются местное или внутривенное введение.

Эффективная дозировка и режим введения антител могут быть определены эмпирически, а принятие таковых решений под силу специалисту данной области. Специалистам данной области будет понятно, что дозировка антител, которые должны быть введены, будет варьироваться в зависимости от, например, субъекта, которому будет вводиться антитело, способа введения, конкретного типа используемого антитела и других вводимых лекарственных средств. 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 глиобластомы, рака молочной железы, колоректального рака, почечноклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, гепатоклеточной карциномы, немелкоклеточного и мелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, острого миелолейкоза, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода, рака желчного пузыря и холангиокарциномы, меланомы, рака желудка, рака мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы головы и шеи или рака матки, эффективность терапевтического антитела может быть оценена различными способами, известными компетентному специалисту в данной области. Например, размер, количество и/или распределение рака у субъекта, проходящего лечение, может контролироваться с помощью стандартных методов визуализации опухоли. Введенное в терапевтических целях антитело, которое блокирует рост опухоли, приводит к уменьшению размера и/или предотвращает развитие новых опухолей в сравнении с течением болезни, которое бы имело место без введения антитела, и является эффективным антителом для лечения рака.

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

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

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

Антитела или ТКР могут также применяться для диагностики *in vivo*. Как правило, антитело помечают радионуклеотидом (таким как  $^{111}\text{In}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$  или  $^{35}\text{S}$ ), 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  $1 \times 10^{-6}$  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: 289, 305 и 306 или вариант такой аминокислотной последовательности.

Для получения Т-клеток *in vitro* могут быть использованы многие другие способы. Например, для получения ЦТЛ используются аутологичные опухоле-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 коstimуляторной 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 дрозиды и Т2-клеток, для презентации антигенов могут использоваться другие клетки, такие как клетки яичника китайского хомяка (CHO), бакуловирус-инфицированные клетки насекомых, бактерии, дрожжи и инфицированные осповакциной клетки-мишени. Кроме того, могут быть использованы растительные вирусы (см., например, работу Porta и соавт. (Porta et al., 1994) в которой описывается разработка мозаичного вируса китайской вигны как высокопродуктивной системы презентации чужеродных пептидов.

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

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

полипептид, включающий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 289, 305 и 306.

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

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

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

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

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 лекарственного средства или в производстве лекарственного средства. 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 глиобластомы, рака молочной железы, колоректального рака, почечноклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, гепатоклеточной карциномы, немелкоклеточного и мелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, острого миелолейкоза, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода, рака желчного пузыря и холангиокарциномы, меланомы, рака желудка, рака мочевого пузыря или рака матки, лекарственное средство по изобретению предпочтительно применяется для лечения глиобластомы, рака молочной железы, колоректального рака, почечноклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, гепатоклеточной карциномы, немелкоклеточного и мелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, острого миелолейкоза, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода, рака желчного пузыря и

холангиокарциномы, меланомы, рака желудка, рака мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы головы и шеи или рака матки.

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

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

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

молочной железы, колоректальным раком, почечноклеточной карциномой, хроническим лимфоцитарным лейкозом, гепатоклеточной карциномой, немелкоклеточным и мелкоклеточным раком легких, неходжкинской лимфомой, острым миелолейкозом, раком яичника, раком поджелудочной железы, раком предстательной железы, раком пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода, раком желчного пузыря и холангиокарциномой, меланомой, раком желудка, раком мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномой головы и шеи или раком матки с различными HLA-A, HLA-B и HLA-C-аллелями. Оно может содержать пептиды, связанные с молекулами MHC I класса и MHC II класса или удлиненные пептиды, связанные с молекулами MHC I класса. Помимо опухолеассоциированных пептидов, собранных из нескольких раковых тканей, 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 глиобластомы, рака молочной железы, колоректального рака, почечноклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, гепатоклеточной карциномы,

немелкоклеточного и мелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, острого миелолейкоза, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода, рака желчного пузыря и холангиокарциномы, меланомы, рака желудка, рака мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы головы и шеи или рака матки пациентов, и кровь здоровых доноров были проанализированы поэтапно:

1. HLA-лиганды из злокачественного материала идентифицировали с помощью масс-спектрометрии.
2. Для идентификации экспрессированных в избытке генов в злокачественной ткани по сравнению с рядом нормальных органов и тканей применяли анализ экспрессии информационной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) всего генома.
3. Идентифицированные HLA-лиганды сравнивали с данными по экспрессии генов. Пептиды, презентруемые в избытке или селективно презентруемые на опухолевой ткани, предпочтительно кодируемые селективно экспрессированными или экспрессированными в избытке генами, выявленными на этапе 2, считали подходящими TUMAP-кандидатами для мультипептидной вакцины.
4. Было произведено изучение литературы для выявления дополнительных свидетельств, подтверждающих релевантность идентифицированных в качестве TUMAP пептидов.
5. Релевантность избыточной экспрессии на уровне мРНК подтверждали повторным обнаружением выбранных на этапе 3 пептидов TUMAP на опухолевой ткани и отсутствием (или нечастым обнаружением) на здоровых тканях.
6. В целях оценки того, может ли быть осуществима индукция *in vivo* Т-клеточных ответов выбранными пептидами, были проведены анализы иммуногенности *in vitro* при использовании человеческих Т-клеток здоровых доноров, а также пациентов, больных раком.

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<sup>+</sup> 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), презентруемых опухолевым образцом отдельного пациента; (б) сравнение идентифицированных на этапе (а)

пептидов с хранилищем (банком данных) пептидов, как описано выше; и (в) выбор по меньшей мере одного пептида из хранилища (банка данных), который коррелирует с опухолеассоциированным пептидом, идентифицированным у пациента. Например, пептиды TUMAP, презентируемые опухолевым образцом, идентифицируют с помощью: (а1) сравнения данных по экспрессии в опухоловом образце с данными нормальной ткани, соответствующей типу ткани опухолевого образца, для идентификации белков, которые в опухоловом 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 опухоловом 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 опухоловом образце с данными нормальной ткани, соответствующей типу ткани опухолевого образца, для идентификации белков, которые в опухоловом 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 опухоловом образце, в целях идентификации лигандов МНС, которые получены из белков, избыточно или аберрантно экспрессируемых опухолью. В качестве другого примера: могут быть идентифицированы белки, имеющие мутации, являющиеся уникальными для опухолевого образца, соотносимого с соответствующей нормальной тканью

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

В отдельном варианте осуществления изобретения пептиды, включенные в вакцину, идентифицируют с помощью: (а) идентификации опухолеассоциированных пептидов (TUMAP), презентруемых опухолевым образцом отдельного пациента способами, описанными выше; (б) сравнения пептидов, идентифицированных на этапе (а) с хранилищем пептидов, как описано выше, которые предварительно прошли скрининг на иммуногенность и избыточную презентацию в опухолях по сравнению с соответствующими нормальными тканями;

(в) выбора по меньшей мере одного пептида из хранилища, который коррелирует с опухолеассоциированным пептидом, идентифицированным у пациента; и (г) факультативно, выбора по меньшей мере одного пептида, идентифицированного *de novo* на этапе (а) с подтверждением его иммуногенности.

В отдельном варианте осуществления изобретения пептиды, включенные в вакцину, идентифицируют с помощью: (а) идентификации опухолеассоциированных пептидов (TUMAP), 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 глиобластомы, рака молочной железы, колоректального рака, почечноклеточной карциномы, хронического лимфоцитарного лейкоза, гепатоклеточной карциномы, немелкоклеточного и мелкоклеточного рака легких, неходжкинской лимфомы, острого миелолейкоза, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода, рака желчного пузыря и холангиокарциномы, меланомы, рака желудка, рака мочевого пузыря, плоскоклеточной карциномы головы и шеи или рака матки, и так как было определено, что данные пептиды не присутствуют или присутствуют в небольшом количестве в нормальных тканях, то эти пептиды могут быть использованы для диагностики наличия рака.

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

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

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

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

## ФИГУРЫ

На Фигурах 1A–T представлена избыточная презентация различных пептидов в нормальных тканях (белые столбцы) и различных видах рака (черные столбцы). Фигура 1A - MET, пептид: GLIAGVVS (SEQ ID NO.: 2) - ткани слева направо: 4 клеточные линии (1 почка, 2 поджелудочные железы, 1 меланома), 24 раковые ткани (1 рак головного мозга, 1 рак желчного пузыря, 7 раков почек, 1 рак прямой кишки, 1 рак печени, 7 раков легких, 2 рака желудка, 4 рака мочевого пузыря); Фигура 1B) - TMEM223, пептид: GLLFSLRSV (SEQ ID NO.: 92) - ткани слева направо: 2 клеточные линии (2 поджелудочные железы), 1 нормальная ткань (1 лимфатический узел), 14 раковых тканей (4 лейкоцитарных лейкоза, 2 рака миелоидных клеток, 1 рак костного мозга, 1 рак молочной железы, 1 рак лимфатических узлов, 1 рак яичника, 2 рака предстательной железы, 1 рак кожи, 1 рак мочевого пузыря). Фигура 1C - PRKDC, пептид: HYSQELSLLYL (SEQ ID NO.: 158) - ткани слева направо: 19 раковых тканей (1 рак головного мозга, 1 рак почек, 2 рака печени, 9 раков легких, 2 рака предстательной железы, 4 рака желудка); Фигура 1D - GPX6, GPX7, пептид: TYSVSFPMF (SEQ ID NO.: 195) - ткани слева направо: 3 клеточные линии (3 доброкачественные гиперплазии предстательной железы), 1 нормальная ткань (1 желудок), 58 раковых тканей (1 рак головного мозга, 2 рака печени, 47 раков легких, 7 раков предстательной железы, 1 рак желудка). На Фигурах 1E–R представлена избыточная презентация различных пептидов в различных раковых тканях по сравнению с нормальными тканями. Анализ включает данные более 490 A\*02-положительных образцов нормальных тканей и 70 A\*24-положительных образцов нормальных тканей, 543 A\*02-положительных раковых образцов и 200 A\*24-положительных раковых образцов. Показаны только образцы, где была обнаружена презентация пептида. Фигура 1E) символ гена: FEN1, пептид: SIYQFLIAV (SEQ ID NO: 8) - ткани слева направо: 2 клеточные линии (1 линия клеток крови, 1 поджелудочная железа), 14 раковых тканей (3 лейкоцитарных лейкоза, 1 рак миелоидных клеток, 1 рак молочной железы, 1 рак желчного пузыря, 1 рак головы и шеи, 1 рак толстой кишки, 2 рака легких, 3 рака лимфатических узлов, 1 рак матки); Фигура 1F) символ гена: DERL3, пептид: ALMAMLVYV (SEQ ID NO: 13) - ткани слева направо: 17 раковых тканей (1 рак желчных протоков, 2 рака молочной

железы, 1 рак желчного пузыря, 3 рака головы и шеи, 7 раков легких, 1 рак лимфатических узлов, 1 рак яичника, 1 рак желудка); Фигура 1G) символ гена: HEATR2, пептид: ALAPHLDDA (SEQ ID NO: 237) - ткани слева направо: 1 клеточная линия (клетки крови), 10 раковых тканей (1 рак миелоидных клеток, 2 рака головного мозга, 1 рак молочной железы, 1 рак легких, 1 рак яичника, 1 рак кожи, 1 рак мочевого пузыря, 2 рака матки); Фигура 1H) символ гена: SLC4A11, пептид: ILLPRIIEA (SEQ ID NO: 259) - ткани слева направо: 1 клеточная линия (1 поджелудочная железа), 27 раковых тканей (3 лейкоцитарных лейкоза, 1 рак головного мозга, 2 рака молочной железы, 3 рака головы и шеи, 1 рак толстой кишки, 1 рак прямой кишки, 6 раков легких, 5 раков яичника, 1 рак поджелудочной железы, 2 рака кожи, 1 рак желудка, 1 рак матки); Фигура 1I) символ гена: ABCC11, пептид: HLLEGSVGV (SEQ ID NO: 39) - ткани слева направо: 7 раковых тканей (5 раков молочной железы, 1 рак печени, 1 рак кожи); Фигура 1J) символ гена: PRAME, пептид: VQLDSIEDLEV (SEQ ID NO: 32) - ткани слева направо: 10 раковых тканей (1 лейкоцитарный лейкоз, 1 рак легких, 4 рака яичника, 3 рака кожи, 1 рак матки); Фигура 1K) символ гена: ZWILCH, пептид: FYSRLLQKF (SEQ ID NO: 203) - ткани слева направо: 1 клеточная линия (1 доброкачественная гиперплазия предстательной железы) 15 раковых тканей (13 раков легких, 2 рака желудка); Фигура 1L) символ гена: PRC1, пептид: NYEYVHKELF (SEQ ID NO: 270) - ткани слева направо: 14 раковых тканей (1 рак головного мозга, 11 раков легких, 2 рака желудка); Фигура 1M) символ гена: GZMK, пептид: KFSSFSLFF (SEQ ID NO: 164) - ткани слева направо: 2 клеточные линии (2 доброкачественные гиперплазии предстательной железы) 14 раковых тканей (11 раков легких, 1 рак предстательной железы, 2 рака желудка); Фигура 1N) символ гена: TREX2, HAUS7, пептид: LYITEPKTI (SEQ ID NO: 287) - ткани слева направо: 12 раковых тканей (3 рака головного мозга, 1 рак печени, 7 раков легких, 1 рак желудка); Фигура 1O) символ гена: DNMBP, пептид: RYISDQLFTNF (SEQ ID NO: 278) - ткани слева направо: 1 нормальная ткань (1 легкое), 31 раковая ткань (2 рака головного мозга, 1 рак почек, 2 рака печени, 20 раков легких, 2 рака предстательной железы, 4 рака желудка); Фигура 1P) символ гена: PTK7, пептид: VYQGHTALL (SEQ ID NO: 277) - ткани слева направо: 2 клеточные линии (2 доброкачественные гиперплазии предстательные

железы), 4 нормальные ткани (1 прямая кишка, 2 легких, 1 поджелудочная железа), 64 раковые ткани (5 раков головного мозга, 48 раков легких, 6 раков предстательной железы, 5 раков желудка); Фигура 1Q) символы гена: NUP210P1, NUP210, пептид: VYVSDIQEL (SEQ ID NO: 288) - ткани слева направо: 2 нормальные ткани (1 толстая кишка, 1 гипофиз), 21 раковая ткань (1 рак печени, 14 раков легких, 1 рак предстательной железы, 5 раков желудка); Фигура 1R) символ гена: ATAD2, пептид: VYTL DIPVL (SEQ ID NO: 160) - ткани слева направо: 17 раковых тканей (1 рак печени, 9 раков легких, 1 рак предстательной железы, 6 раков желудка); Фигура 1S) символ гена: DNTT, пептид: KLFTSVFGV (SEQ ID NO: 305) - ткани слева направо: 5 раковых тканей (5 раков клеток крови); Фигура 1T) символ гена: AR, пептид: ALLSSLNEL (SEQ ID NO: 306) - ткани слева направо: 3 клеточные линии (1 почка, 2 предстательные железы), 4 нормальные ткани (1 печень, 1 легкое, 1 яичник, 1 матка), 29 раковых тканей (1 рак желчных протоков, 2 рака клеток крови, 1 рак головного мозга, 3 рака молочной железы, 1 рак почек, 5 раков печени, 1 рак легких, 1 рак лимфатических узлов, 4 рака яичника, 6 раков предстательной железы, 1 рак мочевого пузыря, 3 рака матки).

На Фигуре 2 A–I представлены примеры профилей экспрессии исходных генов настоящего изобретения, которые в высокой степени экспрессированы в избытке или исключительно экспрессированы при различных видах рака в ряду нормальных тканей (белые столбцы) и различных образцах рака (черные столбцы). Фигура 2A - TNC, пептид: KLLDPQEFTL, (SEQ ID NO.: 59) - ткани слева направо: 73 нормальные ткани (6 артерий, 1 образец клеток крови, 1 головной мозг, 1 сердце, 2 печени, 2 легких, 2 вены, 1 жировая ткань, 1 надпочечная железа, 6 костных мозгов, 1 хрящевая ткань, 1 толстая кишка, 1 пищевод, 2 глаза, 2 желчных пузыря, 1 почка, 6 лимфатических узлов, 5 поджелудочных желез, 2 гипофиза, 1 прямая кишка, 1 слюнная железа, 1 скелетная мышца, 1 кожа, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 щитовидная железа, 7 трахей, 1 мочевой пузырь, 1 молочная железа, 5 яичников, 3 плаценты, 1 предстательная железа, 1 семенник, 1 вилочковая железа, 1 матка) и 46 раковых образцов (24 рака головного мозга, 11 раков легких, 11 раков пищевода). Фигура 2B - LRRC15, пептид: ILNTHITEL, (SEQ ID NO.: 149) - ткани слева

направо: 73 нормальные ткани (6 артерий, 1 образец клеток крови, 1 головной мозг, 1 сердце, 2 печени, 2 легких, 2 вены, 1 жировая ткань, 1 надпочечная железа, 6 костных мозгов, 1 хрящевая ткань, 1 толстая кишка, 1 пищевод, 2 глаза, 2 желчных пузыря, 1 почка, 6 лимфатических узлов, 5 поджелудочных желез, 2 гипофиза, 1 прямая кишка, 1 слюнная железа, 1 скелетная мышца, 1 кожа, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 щитовидная железа, 7 трахей, 1 мочевого пузырь, 1 молочная железа, 5 яичников, 3 плаценты, 1 предстательная железа, 1 семенник, 1 вилочковая железа, 1 матка) и 56 раковых образцов (10 раков молочной железы, 3 рака желчного пузыря, 11 раков желудка, 10 раков лимфатических узлов, 11 раков легких, 11 раков пищевода). Фигура 2C - C1QL1, пептид: TYTTVPRVAF, (SEQ ID NO.: 172) - ткани слева направо: 73 нормальные ткани (6 артерий, 1 образец клеток крови, 1 головной мозг, 1 сердце, 2 печени, 2 легких, 2 вены, 1 жировая ткань, 1 надпочечная железа, 6 костных мозгов, 1 хрящевая ткань, 1 толстая кишка, 1 пищевод, 2 глаза, 2 желчных пузыря, 1 почка, 6 лимфатических узлов, 5 поджелудочных желез, 2 гипофиза, 1 прямая кишка, 1 слюнная железа, 1 скелетная мышца, 1 кожа, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 щитовидная железа, 7 трахей, 1 мочевого пузырь, 1 молочная железа, 5 яичников, 3 плаценты, 1 предстательная железа, 1 семенник, 1 вилочковая железа, 1 матка) и 34 раковых образца (24 рака головного мозга, 10 раков почек). Фигура 2D - AMC2, пептид: GYIDNVTLI, (SEQ ID NO.: 220) - ткани слева направо: 73 нормальные ткани (6 артерий, 1 образец клеток крови, 1 головной мозг, 1 сердце, 2 печени, 2 легких, 2 вены, 1 жировая ткань, 1 надпочечная железа, 6 костных мозгов, 1 хрящевая ткань, 1 толстая кишка, 1 пищевод, 2 глаза, 2 желчных пузыря, 1 почка, 6 лимфатических узлов, 5 поджелудочных желез, 2 гипофиза, 1 прямая кишка, 1 слюнная железа, 1 скелетная мышца, 1 кожа, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 щитовидная железа, 7 трахей, 1 мочевого пузырь, 1 молочная железа, 5 яичников, 3 плаценты, 1 предстательная железа, 1 семенник, 1 вилочковая железа, 1 матка) и 48 раковых образцов (11 раков легких, 11 раков пищевода, 26 раков поджелудочной железы). Фигура 2E - ABCC11, пептид: HLLEGSGGV, (SEQ ID NO.: 39) - ткани слева направо: 6 артерий, 2 образца клеток крови, 6 головных мозгов, 4 сердца, 8 печеней, 6 легких, 2 вены, 1 жировая ткань, 5 надпочечных желез, 1 желчный проток, 5 костных мозгов,

1 хрящевая ткань, 1 грудная стенка и скелетная мышца, 1 толстая кишка, 5 пищеводов, 2 глаза, 2 желчных пузыря, 8 голов и шей, 5 голов и шей и слюнных желез, 1 почка, 6 лимфатических узлов, 4 поджелудочные железы, 3 паращитовидные железы, 2 периферических нерва, 3 брюшины, 2 гипофиза, 3 плевры, 1 прямая кишка, 1 скелетная мышца, 2 кожи, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 щитовидная железа, 7 трахей, 5 мочеточников, 1 мочевого пузыря, 1 молочная железа, 5 яичников, 5 плацент, 1 предстательная железа, 1 семенник, 2 вилочковые железы, 1 матка и 10 образцов рака молочной железы. Фигура 2F - PRAME, пептид: VQLDSIEDLEV, (SEQ ID NO.: 32) - ткани слева направо: 6 артерий, 2 образца клеток крови, 6 головных мозгов, 4 сердца, 8 печеней, 6 легких, 2 вены, 1 жировая ткань, 5 надпочечных желез, 1 желчный проток, 5 костных мозгов, 1 хрящевая ткань, 1 грудная стенка и скелетная мышца, 1 толстая кишка, 5 пищеводов, 2 глаза, 2 желчных пузыря, 8 голов и шей, 5 голов и шей и слюнных желез, 1 почка, 6 лимфатических узлов, 4 поджелудочные железы, 3 паращитовидные железы, 2 периферических нерва, 3 брюшины, 2 гипофиза, 3 плевры, 1 прямая кишка, 1 скелетная мышца, 2 кожи, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 щитовидная железа, 7 трахей, 5 мочеточников, 1 мочевого пузыря, 1 молочная железа, 5 яичников, 5 плацент, 1 предстательная железа, 1 семенник, 2 вилочковые железы, 1 матка и 37 раковых образцов (10 меланом, 17 раков яичника, 10 раков матки). Фигура 2G - SPINK2, пептид: ALSVLRAL, (SEQ ID NO.: 251) - ткани слева направо: 6 артерий, 2 образца клеток крови, 6 головных мозгов, 4 сердца, 8 печеней, 6 легких, 2 вены, 1 жировая ткань, 5 надпочечных желез, 1 желчный проток, 5 костных мозгов, 1 хрящевая ткань, 1 грудная стенка и скелетная мышца, 1 толстая кишка, 5 пищеводов, 2 глаза, 2 желчных пузыря, 8 голов и шей, 5 голов и шей и слюнных желез, 1 почка, 6 лимфатических узлов, 4 поджелудочные железы, 3 паращитовидные железы, 2 периферических нерва, 3 брюшины, 2 гипофиза, 3 плевры, 1 прямая кишка, 1 скелетная мышца, 2 кожи, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 щитовидная железа, 7 трахей, 5 мочеточников, 1 мочевого пузыря, 1 молочная железа, 5 яичников, 5 плацент, 1 предстательная железа, 1 семенник, 2 вилочковые железы, 1 матка и 11 образцов острого миелолейкоза. Фигура 2H - MAGEC2, пептид: TLDEKVAEL, (SEQ ID NO.: 24) - ткани слева направо: 6 артерий,

2 образца клеток крови, 6 головных мозгов, 4 сердца, 8 печеней, 6 легких, 2 вены, 1 жировая ткань, 5 надпочечных желез, 1 желчный проток, 5 костных мозгов, 1 хрящевая ткань, 1 грудная стенка и скелетная мышца, 1 толстая кишка, 5 пищеводов, 2 глаза, 2 желчных пузыря, 8 голов и шей, 5 голов и шей и слюнных желез, 1 почка, 6 лимфатических узлов, 4 поджелудочные железы, 3 паращитовидные железы, 2 периферических нерва, 3 брюшины, 2 гипофиза, 3 плевры, 1 прямая кишка, 1 скелетная мышца, 2 кожи, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 щитовидная железа, 7 трахей, 5 мочеточников, 1 мочевого пузыря, 1 молочная железа, 5 яичников, 5 плацент, 1 предстательная железа, 1 семенник, 2 вилочковые железы, 1 матка и 29 раковых образцов (19 раков печени, 10 меланом). Фигура 2I - C1orf186, пептид: FLTAINYLL, (SEQ ID NO.: 72) - ткани слева направо: 6 артерий, 2 образца клеток крови, 6 головных мозгов, 4 сердца, 8 печеней, 6 легких, 2 вены, 1 жировая ткань, 5 надпочечных желез, 1 желчный проток, 5 костных мозгов, 1 хрящевая ткань, 1 грудная стенка и скелетная мышца, 1 толстая кишка, 5 пищеводов, 2 глаза, 2 желчных пузыря, 8 голов и шей, 5 голов и шей и слюнных желез, 1 почка, 6 лимфатических узлов, 4 поджелудочные железы, 3 паращитовидные железы, 2 периферических нерва, 3 брюшины, 2 гипофиза, 3 плевры, 1 прямая кишка, 1 скелетная мышца, 2 кожи, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 щитовидная железа, 7 трахей, 5 мочеточников, 1 мочевого пузыря, 1 молочная железа, 5 яичников, 5 плацент, 1 предстательная железа, 1 семенник, 2 вилочковые железы, 1 матка и 49 раковых образцов (11 образцов острого миелолейкоза, 17 образцов рака яичника, 11 образцов почечноклеточной карциномы, 10 образцов рака матки).

На Фигуре 1 показаны типичные данные по иммуногенности: результаты проточного цитометрического анализа после пептид-специфического окрашивания мультимеров.

На Фигурах 4A–D представлены отдельные результаты пептид-специфических ответов *in vitro* CD8<sup>+</sup> Т-клеток здорового HLA-A\*02<sup>+</sup> донора. CD8<sup>+</sup> 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: 27 (А, левая секция), пептидом с последовательностью SEQ ID NO: 229 (В, левая секция), пептидом с последовательностью SEQ ID NO: 230 (С, левая секция) и пептидом с последовательностью SEQ ID NO: 235 (D, левая секция), соответственно. После трех циклов стимуляции обнаружение клеток, реагирующих с пептидом, производилось с помощью двойного окрашивания мультимеров, используя A\*02/SeqID No 27 (А), A\*02/SeqID No 229 (В), A\*02/SeqID No 230 (С) или A\*02/SeqID No 235 (D). 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.

На Фигурах 5А–С представлены типичные результаты ответов *in vitro* пептид-специфических CD8+ Т-клеток здорового HLA-A\*24+ донора. CD8+ Т-клетки примировали с помощью искусственных АПК, стимулированных моноклональными антителами к CD28 и HLA-A\*24 в комплексе с пептидом с последовательностью SEQ ID NO: 159 (А, левая секция), пептидом с последовательностью SEQ ID NO: 161 (В, левая секция) и пептидом с последовательностью SEQ ID NO: 281 (С, левая секция), соответственно. После трех циклов стимуляции обнаружение клеток, реагирующих с пептидом, производилось с помощью двойного окрашивания мультимеров, используя A\*24/SeqID No 159 (А), A\*24/SeqID No 161 (В) или A\*24/SeqID No 281 (С). Правые секции (А, В и С) представляют собой контрольное окрашивание клеток, простимулированных нерелевантными комплексами пептида и A\*24. 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, презентуемых на поверхности клетки

#### Образцы тканей

Опухолевые ткани пациентов были получены из:

компаний Asterand (Детройт, Мичиган, США и Ройстон, Хартфордшир, Великобритания); Bio-Options Inc. (Бри, Калифорния, США); BioServe (Белтсвилль, Мэриленд, США); Центра иммунотерапии рака (CCIT), Клиники Херлев (Херлев, Дания); Geneticist Inc. (Глендейл, Калифорния, США); Indivumed GmbH (Гамбург, Германия); Istituto Nazionale Tumori «Pascale» (Неаполь, Италия); Медицинского университета префектуры Киото (KPUH) (Киото, Япония); Медицинского центра Лейденского университета (LUMC) (Лейден, Нидерланды); ProteoGenex Inc. (Кальвер-Сити, Калифорния, США); Клиники св. Саввы (Афины, Греция); Стэнфордского онкологического центра (Стэнфорд, Калифорния, США); Tissue Solutions Ltd (Глазго, Великобритания); Университетской клиники г. Бонн (Бонн, Германия); Университетской клиники г. Женевы (Женева, Швейцария); Университетской клиники г. Гейдельберг (Гейдельберг, Германия); Университетской клиники г. Мюнхен (Мюнхен, Германия); Осацкого городского университета (ОСУ) (Осака, Япония); Университетской клиники г. Тюбинген (Тюбинген, Германия); Университетской клиники Валь д'Хеброн (Барселона, Испания).

Нормальные ткани были получены из

компаний Asterand (Детройт, Мичиган, США и Ройстон, Хартфордшир, Великобритания); BioCat GmbH (Гейдельберг, Германия); Bio-Options Inc. (Бри, Калифорния, США); BioServe (Белтсвилль, Мэриленд, США); Capital BioScience Inc. (Роквилл, Мэриленд, США); Geneticist Inc. (Глендейл, Калифорния, США); Медицинского университета префектуры Киото (KPUH) (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); Осацкого городского университета (ОСУ) (Осака, Япония); 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  $-70^{\circ}\text{C}$  или ниже.

Пептиды выбирали, если три условия соответствовали действительности: (1) Его исходный(ые) транскрипт(ы) и/или экзон(ы) экспрессируются на низких уровнях, т. е. требовалось, чтобы медианное число ридов на тысячу пар нуклеотидов, отнесенное на миллион ридов (RPKM), составляло менее 10 для следующих органов: головной мозг, кровеносный сосуд, сердце, печень, легкие, кровь. Кроме того, требовалось, чтобы медианный показатель RPKM составлял менее 50 для следующих органов: мочевого пузыря, слюнная железа, желудок, надпочечная железа, толстая кишка, тонкая кишка, селезенка, костный мозг, поджелудочная железа, мышца, жировая ткань, кожа, пищевод, почка, щитовидная железа, гипофиз, нерв. (2) Его исходный(ые) транскрипт(ы) и/или экзон(ы) рассматривали как экспрессируемые в избытке, если наивысший 90-ый перцентиль уровня экспрессии в опухолевом образце (на основании данных, полученных с помощью исследовательской сети TCGA (Атлас ракового генома): <http://cancergenome.nih.gov/>) был более чем в 6 раз выше наивысшего 75-ого перцентиля уровней экспрессии для нормальных образцов, определенных, руководствуясь данными банка данных о последовательностях РНК (RNASeq), охватывающего прикл. 3000 образцов нормальных тканей (Lonsdale, 2013). (3) пептид был опухолеассоциированным, т. е. он встречается специфически или на

опухолях или экспрессируется в избытке по сравнению с фоновым уровнем нормальных тканей (ср. Пример 1).

Количество выбранных образцов для пептидов TUMAP, рестриктированных по HLA-A\*02: для рака поджелудочной железы N =16, для рака почки N = 20, для колоректального рака N =28, для рака пищевода, в том числе рака пищеводно-желудочного перехода N = 17, для опухолей предстательной железы N =39, для гепатоклеточной карциномы N =16, для немелкоклеточного рака легких N =90, для рака желудка N =29, для рака молочной железы N =17, для меланомы N =7, для рака яичника N =20, для хронического лимфоцитарного лейкоза N =17, для рака мочевого пузыря N = 16, для мелкоклеточного рака легких N = 19, для рака желчного пузыря и холангиокарциномы N = 6, для острого миелолейкоза N = 18, для глиобластомы N =41, для рака яичка N = 1, для неходжкинской лимфомы N = 18, для рака матки N = 15 и для нормальных тканей N = 262.

Количество выбранных образцов для пептидов TUMAP, рестриктированных по HLA-A\*24: для рака желудка N = 44, для опухолей предстательной железы N = 40, для немелкоклеточного рака легких N = 91, для гепатоклеточной карциномы N = 15, для рака почки N = 2, для колоректального рака N = 1, для глиобластомы N = 18 и для нормальных тканей N = 70.

На Фигуре 1 также представлены результаты для линий клеток, в том числе линий клеток рака почек, линий клеток меланомы, линий клеток рака поджелудочной железы и доброкачественных гиперплазий предстательной железы.

#### 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 пяти особенно многочисленных ионах-предшественниках с динамическим исключением отобранных ранее ионов. Tandемные масс-спектры интерпретировали при помощи программы SEQUEST с дополнительным контролем вручную. Идентифицированную пептидную последовательность подтверждали сравнением полученной картины фрагментации природного пептида с картиной фрагментации синтетического контрольного пептида с идентичной последовательностью.

Относительное количественное определение методом ЖХ/МС без изотопных меток проводили путем подсчета ионов, т. е. с помощью экстракции и анализа результатов ЖХ/МС (Mueller et al., 2007). Этот метод основан на предположении,

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

Профили презентации типичных пептидов, презентуемых в избытке, показаны на Фигуре 1. Показатели презентации отдельных пептидов показаны в Таблице 15 и Таблице 16.

В Таблицах 13 (А и Б) и Таблице 14 (А и Б) показана презентация выбранных пептидов при различных раковых заболеваниях, и, таким образом, особая значимость упомянутых пептидов для диагностики и/или лечения указанных видов рака (например, пептид с последовательностью с SEQ ID No. 1 – для глиобластомы, немелкоклеточного рака легких и рака яичника, пептид с последовательностью с SEQ ID No. 2 – для глиобластомы, рака желудка, немелкоклеточного рака легких, рака мочевого пузыря, аденокарциномы желчного пузыря и холангиокарциномы,

почечноклеточной карциномы, колоректального рака и рака поджелудочной железы).

Таблица 13А: Сводка данных презентации выбранных опухолеассоциированных пептидов, связывающихся с молекулами HLA-A\*02, настоящего изобретения по видам заболеваний.

ГБ = глиобластома, РМЖ= рак молочной железы, КРК = колоректальный рак, ПКК = почечноклеточная карцинома, ХЛЛ = хронический лимфоцитарный лейкоз, ГКК = гепатоклеточная карцинома, НМРЛ= немелкоклеточный рак легких, МРЛ = мелкоклеточный рак легких, НХЛ = неходжкинская лимфома, ОМЛ = острый миелоидный лейкоз, РЯ = рак яичника, РПЖ = рак поджелудочной железы, РПрЖ = рак предстательной железы и доброкачественная гиперплазия предстательной железы, РП = рак пищевода, в том числе желудочно-пищеводное соединение, РЖП\_ХК = аденокарцинома желчного пузыря и холангиокарцинома, МЕЛ = меланома, РЖ = рак желудка, РМП = рак мочевого пузыря, РМ = рак матки.

| SEQ ID No. | Последовательность | Презентация пептидов при раковых заболеваниях |
|------------|--------------------|-----------------------------------------------|
| 1          | LLYPEPWSV          | ГБ, НМРЛ, РЯ                                  |
| 2          | GLIAGVVS           | ГБ, РЖ, НМРЛ, РМП, РЖП_ХК, ПКК, КРК, РПЖ      |
| 3          | KLEENGDLYL         | НМРЛ, РЯ, МРЛ, РМП, РМЖ, РЖП_ХК, МЕЛ, НХЛ     |
| 4          | KLMPGTYTL          | НМРЛ, РЯ, РЭМ, ОМЛ, НХЛ                       |
| 5          | GIVAHIQEV          | РЖ, НМРЛ, РПрЖ, ХЛЛ, РП, РЯ, КРК, ОМЛ, НХЛ    |
| 6          | ALFDSL RHV         | ГБ                                            |
| 7          | ILDHEVPSL          | НМРЛ, ХЛЛ, РП, РЯ, РМП, МЕЛ, ПКК, ОМЛ,        |
| 8          | SIYQFLIAV          | НМРЛ, ХЛЛ, РЖП_ХК, ОМЛ, НХЛ                   |
| 9          | FLVDGSYSI          | НМРЛ, РП, РЖП_ХК, КРК                         |
| 10         | GIAGSLKTV          | НМРЛ, РП, РМП, РЭМ, КРК, ОМЛ                  |
| 11         | ALSPSYLTV          | РЖ, НМРЛ, ХЛЛ, РМЖ, РЖП_ХК, НХЛ               |
| 12         | GLLPLHRA           | ГБ, НМРЛ, РЭМ, ПКК                            |
| 13         | ALMAMLVYV          | РЖ, НМРЛ, РЯ, МРЛ, РМЖ, РЖП_ХК                |
| 14         | ILAKDLFEI          | НМРЛ, ГКК, РП, РМП, ОМЛ, НХЛ                  |
| 15         | YLDLSHNQL          | НМРЛ, ХЛЛ, РМЖ, РЖП_ХК                        |
| 16         | YTLDIPVLFV         | НМРЛ, ГКК, ХЛЛ, МЕЛ, НХЛ                      |
| 17         | AVFPDDMPTL         | РЖ, НМРЛ, РП, РЯ, НХЛ                         |
| 18         | ILLDLTDNRL         | НМРЛ, РП, РМП, РМЖ, МЕЛ, ПКК, КРК             |
| 19         | SISDNVWEV          | ГБ, РП, РЯ, РЭМ, МРЖ, МЕЛ, НХЛ                |

| SEQ ID No. | Последовательность | Презентация пептидов при раковых заболеваниях |
|------------|--------------------|-----------------------------------------------|
| 20         | GLSQITNQL          | ХЛЛ, РМП, НХЛ                                 |
| 21         | AIQDEIRSV          | ГБ, НМРЛ, РП, РЯ, РМЖ, НХЛ                    |
| 22         | FVDPNTQEKV         | РЖ, ГKK, РП, РЯ, РМП, РМЖ,                    |
| 23         | SLFSDEFKV          | НМРЛ, РП, РМП, ПКК, КРК, ОМЛ                  |
| 24         | TLDEKVAEL          | НМРЛ, ГKK, РП, МЕЛ                            |
| 25         | TMDSVLVTV          | РЯ, РЭМ                                       |
| 26         | ALQEELTEL          | РМЖ, РЖП_ХК, МЕЛ, ОМЛ, НХЛ                    |
| 27         | RLMEENWNA          | НМРЛ, РП, РЯ, РЭМ, КРК                        |
| 28         | SLPNGKPVSV         | НМРЛ, РЯ, РМП, НХЛ                            |
| 29         | YLLDPSITL          | НМРЛ, ХЛЛ, РМЖ, РЖП_ХК, ОМЛ, НХЛ              |
| 30         | AMIEEVFEA          | РПРЖ, РЯ, МРЛ, РМП, РМЖ, МЕЛ                  |
| 31         | TITETTVEV          | ГБ                                            |
| 32         | VQLDSIEDLEV        | ХЛЛ, РЯ                                       |
| 33         | YIKTELISV          | РЖ, НМРЛ, РП, РЯ, НХЛ                         |
| 34         | FLLATEVVTV         | РЯ, МРЛ, ОМЛ, НХЛ                             |
| 35         | FLLPFSTVYL         | НМРЛ, ХЛЛ, РЯ, ОМЛ, НХЛ                       |
| 36         | SLADTNSLAVV        | МРЛ, МЕЛ                                      |
| 37         | ILAPFSVDL          | ОМЛ                                           |
| 38         | FLGPRIIGL          | ХЛЛ, ОМЛ, НХЛ                                 |
| 39         | HLLEGSVGV          | РМЖ                                           |
| 40         | VLIDPQWVLTA        | РЯ, НХЛ                                       |
| 41         | ALFENTPKA          | ГБ                                            |
| 42         | LLDSVSRL           | НМРЛ, РЖП_ХК, КРК                             |
| 43         | KAIEVLLTL          | РЖ, РП, ОМЛ                                   |
| 44         | SLFETAWEA          | НМРЛ, МЕЛ, ОМЛ, НХЛ                           |
| 45         | SLTEVSLPL          | РЯ, РЖП_ХК, ОМЛ, НХЛ                          |
| 46         | SQFPLPLAV          | РЖ, НМРЛ, РП, РМП                             |
| 47         | ALLERGELFV         | НМРЛ, ХЛЛ, РЯ, НХЛ                            |
| 48         | QVIEDSTGV          | РЖ, НМРЛ, РП, РЯ                              |
| 49         | ALNIATHVL          | НМРЛ, ХЛЛ, РМП, НХЛ                           |
| 50         | ILFHGVFYA          | НМРЛ, РЯ, РМП, РМЖ                            |
| 51         | LLFSRLCGA          | ГБ, НМРЛ                                      |
| 52         | RLAVLFSGA          | РЖ, НМРЛ, РП, РЯ                              |
| 53         | KMVGLVVAI          | ХЛЛ, ОМЛ, НХЛ                                 |
| 54         | VLNPLITAV          | НМРЛ, РПРЖ, ОМЛ, НХЛ                          |
| 55         | SLATKIVEA          | РПРЖ, РЯ, РМЖ, ОМЛ                            |
| 56         | FLHDEKEGIYI        | НМРЛ, РЯ, НХЛ                                 |
| 57         | TVFTDHMLTV         | НМРЛ, РП, РЯ, НХЛ                             |
| 58         | YLLPLL PAL         | ГБ                                            |

| SEQ ID No. | Последовательность | Презентация пептидов при раковых заболеваниях                     |
|------------|--------------------|-------------------------------------------------------------------|
| 59         | KLLDPQEFTL         | ГБ, НМРЛ                                                          |
| 60         | ALFAPLVHL          | ОМЛ                                                               |
| 61         | AIVKEIVNI          | РЖ, НМРЛ, РП                                                      |
| 62         | ALNPELVQA          | ГБ, НМРЛ, ПКК                                                     |
| 63         | SQIPAQPSV          | РЖ, НМРЛ, РП                                                      |
| 64         | SLFPDSLIV          | РПрЖ                                                              |
| 65         | SVVPDVRVS          | РЖ, НМРЛ, РП                                                      |
| 66         | KLIFSVEAV          | НМРЛ, МРЛ, РЭМ, РМЖ                                               |
| 67         | TLLQRLTEV          | НМРЛ, ХЛЛ, ПКК, ОМЛ                                               |
| 68         | SLSNRLYYL          | РЖ, РП, КРК                                                       |
| 69         | FLAVGLVDV          | ОМЛ, НХЛ                                                          |
| 70         | LLLGDSALYL         | ПКК, НХЛ                                                          |
| 71         | VLHSKFWVV          | ХЛЛ, НХЛ                                                          |
| 72         | FLTAINYLL          | РЯ, ПКК                                                           |
| 73         | YTLREVDTV          | НМРЛ, РП, РЯ                                                      |
| 74         | TLFGYSVVL          | ОМЛ                                                               |
| 75         | AVIKFLELL          | РЖ, НМРЛ, РП                                                      |
| 76         | AVGPVHNSV          | РЖ, РП                                                            |
| 77         | TLIDEQDIPLV        | НМРЛ, РЯ, МРЛ                                                     |
| 78         | TVVTRLDEI          | РЖ, РП, РЯ                                                        |
| 79         | VTFKEYVTV          | РЖ, НМРЛ, РП                                                      |
| 80         | KLYEADFVL          | НМРЛ, ОМЛ, НХЛ                                                    |
| 81         | NALDKVLSV          | РЖ, НМРЛ, РП                                                      |
| 82         | FIFDEAEKL          | РЖ, НМРЛ, РП                                                      |
| 83         | GQASYFYVA          | КРК, ОМЛ                                                          |
| 84         | ALCPRIHEV          | ГБ                                                                |
| 85         | VLNDILVRA          | РЯ, РЭМ                                                           |
| 86         | SVDSHFQEV          | РЖ, РП, РЯ                                                        |
| 87         | TIYKDFVYI          | РЖ, НМРЛ, РП                                                      |
| 88         | AQADHLPQL          | РЖ, НМРЛ, РП                                                      |
| 89         | QLAPVFQRV          | ХЛЛ, РЯ, НХЛ                                                      |
| 90         | FLQDLEQRL          | РЖ, НМРЛ, РПрЖ, ХЛЛ, РП, РЯ, МРЛ, РМП, РЭМ, РМЖ, РЖП_ХК, КРК, НХЛ |
| 91         | KLFDESILI          | РЖ, НМРЛ, РПрЖ, ХЛЛ, РП, РЯ, МРЛ, РЭМ, РМЖ, ОМЛ, НХЛ              |
| 92         | GLLFSLRSV          | НМРЛ, ГКК, РПрЖ, ХЛЛ, РП, РЯ, РМП, РМЖ, МЕЛ, ПКК, КРК, ОМЛ, НХЛ   |
| 93         | QVLELDVADI         | РЖ, НМРЛ, РПрЖ, МРЛ, РМП, РЭМ, РМЖ, КРК, ОМЛ, НХЛ                 |
| 94         | LLPAVPVGA          | ГБ, НМРЛ, РЯ, РМП, КРК, ОМЛ                                       |

| SEQ ID No. | Последовательность | Презентация пептидов при раковых заболеваниях |
|------------|--------------------|-----------------------------------------------|
| 95         | GLLGSLFFL          | НМРЛ, РЯ, МРЛ, РЭМ, РМЖ, РЖП, ХК, ОМЛ, НХЛ    |
| 96         | LLVSHLYLV          | НМРЛ, ХЛЛ, РЯ, РМП, НХЛ                       |
| 97         | STLPKSLSL          | ГБ, РЖ, НМРЛ, ГKK, РПpЖ, РП, РЯ, РМЖ, НХЛ     |
| 98         | RLFPDFFTRVAL       | НМРЛ                                          |
| 99         | YLLQSVNQLLL        | НМРЛ, ХЛЛ, НХЛ                                |
| 100        | ALLGMIIIVGV        | РПpЖ, МРЛ, РМЖ                                |
| 101        | ALADFMLS           | ОМЛ                                           |
| 102        | VLLDIQEVFQI        | ОМЛ                                           |
| 103        | YLVSEIFKA          | ОМЛ                                           |
| 104        | ALISWQPPRA         | ГБ                                            |
| 105        | ALLGTKILL          | НХЛ                                           |
| 106        | FINDSIVYL          | ОМЛ                                           |
| 107        | LLVPTSGIYFV        | НХЛ                                           |
| 108        | ILLKNLVTI          | РМЖ                                           |
| 109        | SLDPSVTHL          | РЭМ                                           |
| 110        | FLLGVSKEV          | МЕЛ                                           |
| 111        | AIVDLIHDI          | РЖ, НМРЛ, РП                                  |
| 112        | SLGKFTFDV          | НМРЛ, РЭМ                                     |
| 113        | FLERGLESA          | РЖ, РП, РМП                                   |
| 114        | QLIQTLHAV          | РЯ, ПКК                                       |
| 115        | SLDPDTLPAV         | НМРЛ, РЯ                                      |
| 116        | TIDESGSIL          | РМП, НХЛ                                      |
| 117        | KMPDVELFV          | НМРЛ                                          |
| 118        | QLWQFLVTL          | РЯ                                            |
| 119        | FIIQGLRSVGA        | НМРЛ, РЯ                                      |
| 120        | VTPVTVSAV          | РЖ, РП                                        |
| 121        | FTIFRTISV          | ХЛЛ                                           |
| 122        | GVVDPVHGV          | РЖ, НМРЛ, РП                                  |
| 123        | VLDPALPALV         | РЯ, РМП                                       |
| 124        | KVMATIEKV          | НМРЛ, РЯ                                      |
| 125        | SLADYEHFV          | ГБ, РПpЖ                                      |
| 126        | QMFQYFITV          | НМРЛ, ХЛЛ                                     |
| 127        | KLDGNELDL          | НМРЛ                                          |
| 128        | TQSPATLSV          | РЖ, РП                                        |
| 129        | RLQDILWFL          | НМРЛ, ОМЛ                                     |
| 130        | SLLGGTFVGI         | РМП                                           |
| 131        | VTSNSGILGV         | ХЛЛ, НХЛ                                      |
| 132        | ILGEVLAQL          | ХЛЛ, НХЛ                                      |
| 133        | ALLPRLHQL          | РПpЖ                                          |

| SEQ ID No. | Последовательность | Презентация пептидов при раковых заболеваниях                                        |
|------------|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 134        | GLAVPTPSV          | НМРЛ, РЯ                                                                             |
| 135        | HLSTIIIEA          | НМРЛ, ХЛЛ                                                                            |
| 136        | FLFGGVLMTL         | РЯ, НХЛ                                                                              |
| 137        | EIASITEQL          | ГБ, НМРЛ                                                                             |
| 138        | ALLAKILQI          | ГБ, РЖ, НМРЛ, ГKK, РПрЖ, ХЛЛ, РП, РЯ, МРЛ, РМП, РМЖ, РЖП_ХК, МЕЛ, ПКК, КРК, ОМЛ, НХЛ |
| 139        | FLLPTGAEA          | РЖ, НМРЛ, ГKK, РПрЖ, ХЛЛ, РП, РЯ, МРЛ, РМП, РЭМ, РМЖ, МЕЛ, ПКК, КРК, РПЖ, ОМЛ, НХЛ   |
| 140        | VLLEEELEAL         | НМРЛ, РПрЖ, ХЛЛ, РП, РЯ, МРЛ, РЭМ, РМЖ, РЖП_ХК, МЕЛ, ОМЛ, НХЛ                        |
| 141        | FLDKVLVAA          | РЖ, НМРЛ, РПрЖ, ХЛЛ, РП, РМП, ПКК, ОМЛ, НХЛ                                          |
| 142        | ILVEGISTV          | ГБ, НМРЛ, РПрЖ, РЯ, МРЛ, РМЖ, РЖП_ХК                                                 |
| 143        | ALLPELREV          | ГБ, РЖ, НМРЛ, ГKK, РМЖ, РЖП_ХК, ПКК, КРК                                             |
| 144        | ALLAFFPGL          | ГБ, РЖ, НМРЛ, РП, РЯ, РМП, РМЖ, МЕЛ, КРК, РПЖ, ОМЛ, НХЛ                              |
| 145        | YLWATIQRI          | НМРЛ, РП, РЯ, ОМЛ                                                                    |
| 146        | ALHFSEDEI          | РПрЖ, РЭМ                                                                            |
| 147        | YLMDDTVEI          | РЯ, РЖП_ХК                                                                           |
| 148        | MLAGIAITV          | ГБ, РЖП_ХК                                                                           |
| 149        | ILNTHITEL          | НХЛ                                                                                  |
| 150        | VLYDRPLKI          | НМРЛ, ХЛЛ, РП, РЯ, МЕЛ, ПКК, КРК, НХЛ                                                |
| 151        | SVLDSTAKV          | РЖ, НМРЛ, РП, РЯ, РМП, РМЖ, ПКК, КРК, НХЛ                                            |
| 152        | MMVGDLLEV          | ГБ, РЖ, НМРЛ, ХЛЛ, МЕЛ, КРК, ОМЛ, НХЛ                                                |
| 153        | FISERVEVV          | НМРЛ, РПрЖ, ХЛЛ, РП, РЯ, РМП, НХЛ                                                    |
| 154        | RLLGTEFQV          | НМРЛ, ГKK, МЕЛ,                                                                      |
| 155        | LLNPVVEFV          | ХЛЛ, РЯ, РЖП_ХК, НХЛ                                                                 |
| 156        | ILGDLSHLL          | НМРЛ, РПЖ                                                                            |
| 157        | TLTSLLAQA          | РМП                                                                                  |
| 229        | AILAHLNTV          | ГБ, НМРЛ, ГKK, ХЛЛ, РП, РЯ, МРЛ, РМП, РМЖ, КРК, ОМЛ, НХЛ                             |
| 230        | KLQNIMMLL          | НМРЛ, ГKK, ХЛЛ, РМП, РМЖ, РЖП_ХК, ПКК, КРК, ОМЛ, НХЛ                                 |
| 231        | MLDKYSHYL          | НМРЛ, ХЛЛ, РП, РЯ, НХЛ                                                               |
| 232        | KIFPAALQLV         | НМРЛ, ГKK, ХЛЛ, РЯ, МРЛ, РМП, РЭМ, РЖП_ХК, КРК, НХЛ                                  |
| 233        | HLFDAFVSV          | НМРЛ, РМП, РМЖ, КРК, ОМЛ, НХЛ                                                        |
| 234        | LLSPHNPAL          | НМРЛ, ХЛЛ, РП, РЯ, РМП, РМЖ, НХЛ                                                     |
| 235        | KIIDFLSAL          | РЯ, РЭМ, ОМЛ, НХЛ                                                                    |
| 236        | STIAILNSV          | ГБ, РЖ, НМРЛ, РПрЖ, ХЛЛ, РП, НХЛ                                                     |
| 237        | ALAPHLDDA          | ГБ, НМРЛ, ГKK, РЯ, РМП, РЭМ, РМЖ, МЕЛ                                                |
| 238        | GLYERPTAA          | НМРЛ, РПрЖ, РПЖ, ОМЛ                                                                 |

| SEQ ID No. | Последовательность | Презентация пептидов при раковых заболеваниях                               |
|------------|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| 239        | KMNESTRSV          | НМРЛ, РЖП_ХК, НХЛ                                                           |
| 240        | YMGEEKLIASV        | НМРЛ, ХЛЛ, РЯ, РМП, МЕЛ,                                                    |
| 241        | KTIQQLETV          | НМРЛ, РЯ, НХЛ                                                               |
| 242        | WLYGEDHQL          | НМРЛ, РЭМ, ОМЛ                                                              |
| 243        | FMADDIFSV          | НХЛ                                                                         |
| 244        | YLLEKNRVV          | НМРЛ, РП, РЯ                                                                |
| 245        | SLLDLPLSL          | ХЛЛ, НХЛ                                                                    |
| 246        | TVSDVLNSV          | ГБ, НМРЛ, ХЛЛ                                                               |
| 247        | ALYEGYATV          | НМРЛ, ГKK, ХЛЛ, РП, РЯ, МРЛ, РМП, РЭМ, РМЖ, РЖП_ХК, МЕЛ, ПКК, КРК, РПЖ, НХЛ |
| 248        | YLDRFLAGV          | ГБ, НМРЛ, РПрЖ, ХЛЛ, КРК, ОМЛ, НХЛ                                          |
| 249        | GLCERLVSL          | ГБ, НМРЛ, ХЛЛ, ПКК, КРК                                                     |
| 250        | SLAPATPEV          | МЕЛ, НХЛ                                                                    |
| 251        | ALSVLRLAL          | ОМЛ                                                                         |
| 252        | RLMEICESL          | ОМЛ                                                                         |
| 253        | ALAEIDNSL          | ХЛЛ                                                                         |
| 254        | KLQGKLPEL          | НМРЛ, НХЛ                                                                   |
| 255        | SLLHFTENL          | ОМЛ, НХЛ                                                                    |
| 256        | SLGEEQFSV          | МЕЛ, НХЛ                                                                    |
| 257        | GLYTDPCGV          | НМРЛ, НХЛ                                                                   |
| 258        | LLSERFINV          | ГKK, РПрЖ                                                                   |
| 259        | ILLPRIIEA          | НМРЛ, РЯ                                                                    |
| 260        | ILLEKILSL          | НМРЛ, КРК                                                                   |
| 261        | QLQDRVYAL          | НМРЛ, ГKK, ХЛЛ, РП, РЯ, МРЛ, РМП, РМЖ, ПКК, КРК, НХЛ                        |
| 262        | FMVDKAIYL          | РЖ, НМРЛ, РПрЖ, РП, РЯ, МРЛ, РМЖ, РЖП_ХК, КРК, РПЖ, НХЛ                     |
| 263        | VLLSEQGDVKL        | НМРЛ, РПрЖ, ХЛЛ, РП, РЯ, МЕЛ, НХЛ                                           |
| 264        | KLFPQETLFL         | НМРЛ, ХЛЛ, РП, ОМЛ, НХЛ                                                     |
| 265        | NTCPYVHNI          | ГБ, ХЛЛ                                                                     |
| 266        | YAIGLVMRL          | ХЛЛ, РМЖ, ОМЛ                                                               |
| 290        | KIVDFSYSV          | ГБ, РЖ, НМРЛ, ГKK, РП, РЯ, МРЛ, РМП, РЭМ, РМЖ, МЕЛ, КРК, ОМЛ, НХЛ           |
| 291        | KLDETGNSL          | ГБ, РЖ, НМРЛ, ГKK, ХЛЛ, РП, РЯ, МРЛ, РМП, РЭМ, МЕЛ, ПКК, КРК, РПЖ, ОМЛ, НХЛ |
| 292        | GMMTAILGV          | ГБ, РЖ, НМРЛ, ГKK, РПрЖ, ХЛЛ, РЭМ, РЖП_ХК, ПКК, КРК, РПЖ, ОМЛ, НХЛ          |
| 293        | FLVDGSWSI          | ГБ                                                                          |
| 294        | GLMKYIGEV          | РПрЖ                                                                        |

В Таблице 13Б представлена презентация выбранных пептидов при дополнительных видах раковых заболеваний и, таким образом, особая значимость упомянутых пептидов для диагностики и/или лечения указанных видов рака.

Таблица 13В: Сводка данных презентации выбранных опухолеассоциированных пептидов, связывающихся с молекулами HLA-A\*02, настоящего изобретения по видам заболеваний.

ГБ = глиобластома, РМЖ= рак молочной железы, КРК = колоректальный рак, ПКК = почечноклеточная карцинома, ХЛЛ = хронический лимфоцитарный лейкоз, ГКК = гепатоклеточная карцинома, НМРЛ= немелкоклеточный рак легких, МРЛ = мелкоклеточный рак легких, НХЛ = неходжкинская лимфома, ОМЛ = острый миелоидный лейкоз, РЯ = рак яичника, РПЖ = рак поджелудочной железы, РПрЖ = рак предстательной железы и доброкачественная гиперплазия предстательной железы, РП = рак пищевода, в том числе желудочно-пищеводное соединение, РЖП\_ХК = аденокарцинома желчного пузыря и холангиокарцинома, МЕЛ = меланома, РЖ = рак желудка, РМП = рак мочевого пузыря, РМ = рак матки.

| SEQ ID No. | Последовательность | Презентация пептидов при раковых заболеваниях |
|------------|--------------------|-----------------------------------------------|
| 1          | LLYPEPWSV          | МРЛ, РЭМ, ПлККГШ                              |
| 2          | GLIAGVVS           | ГКК, РЭМ, ПлККГШ                              |
| 3          | KLEENGDLYL         | ГКК, РЭМ, ОМЛ, ПлККГШ                         |
| 4          | KLMPGTYTL          | МЕЛ, ПлККГШ                                   |
| 5          | GIVAHIQEV          | РЭМ, МЕЛ                                      |
| 7          | ILDHEVPSL          | ПлККГШ                                        |
| 8          | SIYQFLIAV          | РЭМ, РМЖ, КРК, ПлККГШ                         |
| 10         | GIAGSLKTV          | МРЛ, МЕЛ, ОМЛ                                 |
| 11         | ALSPSYLTV          | ПлККГШ                                        |
| 12         | GLLPLLHRA          | МЕЛ, ПКК                                      |
| 13         | ALMAMLVYV          | РЖП_ХК, МЕЛ, НХЛ, ПлККГШ                      |
| 14         | ILAKDLFEI          | МРЛ                                           |
| 15         | YLDLSHNQL          | РП, РЖП_ХК, ПлККГШ                            |
| 16         | YTLDIPVLFGV        | ПлККГШ                                        |
| 18         | ILLDLTDNRL         | ОМЛ, ПлККГШ                                   |
| 19         | SISDNWWEV          | ПлККГШ                                        |
| 20         | GLSQITNQL          | МЕЛ, ОМЛ                                      |
| 21         | AIQDEIRSV          | МЕЛ, КРК, ОМЛ                                 |

| SEQ ID No. | Последовательность | Презентация пептидов при раковых заболеваниях |
|------------|--------------------|-----------------------------------------------|
| 22         | FVDPNTQEKV         | ПлККГШ                                        |
| 23         | SLFSDEFKV          | МЕЛ                                           |
| 26         | ALQEELTEL          | НМРЛ, КРК, ПлККГШ                             |
| 28         | SLPNGKPVSV         | РП, МРЛ, ПлККГШ                               |
| 29         | YLLDPSITL          | ГКК, МРЛ, МЕЛ, ПлККГШ                         |
| 30         | AMIEEVFEA          | НМРЛ, ГКК, РЭМ, РЖП_ХК, НХЛ, ПлККГШ           |
| 32         | VQLDSIEDLEV        | НМРЛ, РЯ, РЭМ, МЕЛ                            |
| 33         | YIKTELISV          | ГКК                                           |
| 35         | FLLPFSTVYL         | ПлККГШ                                        |
| 38         | FLGPRIIGL          | КРК                                           |
| 39         | HLLEGSGVG          | ГКК, МЕЛ                                      |
| 40         | VLIDPQWVLTA        | КРК                                           |
| 42         | LLDSVSRL           | КРК                                           |
| 43         | KAIEVLLTL          | НМРЛ, ОМЛ                                     |
| 44         | SLFETAWEA          | РЭМ, КРК, ПлККГШ                              |
| 45         | SLTEVSLPL          | НМРЛ, КРК, ПлККГШ                             |
| 46         | SQFPLPLAV          | МЕЛ, ПлККГШ                                   |
| 47         | ALLERGELFV         | РП, РМП, ОМЛ                                  |
| 48         | QVIEDSTGV          | РЯ                                            |
| 49         | ALNIATHVL          | КРК                                           |
| 50         | ILFHGVFYA          | МРЛ                                           |
| 51         | LLFSRLCGA          | РЭМ                                           |
| 52         | RLAVLFSGA          | ГКК                                           |
| 53         | KMVGLVVAI          | МЕЛ                                           |
| 54         | VLNPLITAV          | ГКК, МРЛ, РЭМ, МЕЛ, ПКК                       |
| 55         | SLATKIVEA          | ОМЛ                                           |
| 56         | FLHDEKEGIYI        | ОМЛ                                           |
| 60         | ALFAPLVHL          | НХЛ                                           |
| 63         | SQIPAQPSV          | ОМЛ, ПлККГШ                                   |
| 64         | SLFPDSLIV          | НМРЛ, ГКК, РМЖ, РПЖ                           |
| 66         | KLIFSVEAV          | РЯ, РМП, РМЖ                                  |
| 67         | TLLQRLTEV          | НХЛ                                           |
| 69         | FLAVGLVDV          | МРЛ                                           |
| 70         | LLLGDSALYL         | КРК                                           |
| 72         | FLTAINYLL          | РЭМ, ПКК, ОМЛ                                 |
| 73         | YTLREVDTV          | ОМЛ                                           |
| 76         | AVGPVHNSV          | НМРЛ                                          |
| 77         | TLIDEQDIPLV        | МРЛ, НХЛ, ПлККГШ                              |
| 85         | VLNDILVRA          | РЭМ                                           |

| SEQ ID No. | Последовательность | Презентация пептидов при раковых заболеваниях |
|------------|--------------------|-----------------------------------------------|
| 86         | SVDSHFQEV          | НМРЛ, РЯ                                      |
| 87         | TIYKDFVYI          | РЯ                                            |
| 90         | FLQDLEQRL          | ПлККГШ                                        |
| 91         | KLFDESILI          | ГКК, ПлККГШ                                   |
| 92         | GLLFSLSRSV         | МРЛ, ПлККГШ                                   |
| 93         | QVLELDVADI         | ПлККГШ                                        |
| 94         | LLLPAVPVGA         | МРЛ                                           |
| 95         | GLLGSLFFL          | РЖ, РП, РМП, МЕЛ, ПКК, КРК, РПЖ, ПлККГШ       |
| 96         | LLVSHLYLV          | РЭМ, КРК, ПлККГШ                              |
| 98         | RLFPDFFTRVAL       | НМРЛ                                          |
| 100        | ALLGMIIVGV         | ГКК, ОМЛ                                      |
| 106        | FINDSIVYL          | НМРЛ, ГКК, КРК, НХЛ                           |
| 110        | FLLGVSKEV          | НХЛ                                           |
| 116        | TIDESGSIL          | МЕЛ, ОМЛ                                      |
| 117        | KMPDVELFV          | НМРЛ, МРЛ, МЕЛ                                |
| 118        | QLWQFLVTL          | МЕЛ                                           |
| 123        | VLDPALPALV         | НМРЛ, РЭМ, ПлККГШ                             |
| 126        | QMFQYFITV          | РЭМ                                           |
| 130        | SLLGGTFVGI         | ГКК                                           |
| 134        | GLAVPTPSV          | ПлККГШ                                        |
| 135        | HLSTIIEHA          | ХЛЛ, РЭМ                                      |
| 138        | ALLAKILQI          | ПлККГШ                                        |
| 139        | FLLPTGAEA          | РЖП_ХК, ПлККГШ                                |
| 140        | VLLEELEAL          | ГКК, КРК, ПлККГШ                              |
| 141        | FLDKVLVAA          | ГКК, РЯ, РЭМ, РМЖ, МЕЛ, КРК, ПлККГШ           |
| 143        | ALLPELREV          | РЯ, МРЛ, ОМЛ, ПлККГШ                          |
| 145        | YLWATIQR           | РЭМ                                           |
| 148        | MLAGIAITV          | РЖП_ХК, НХЛ                                   |
| 149        | ILNTHITEL          | РМЖ                                           |
| 150        | VLYDRPLKI          | ГКК, МРЛ, РЭМ, РМЖ                            |
| 151        | SVLDSTAKV          | ГКК, РЭМ, РЖП_ХК, МЕЛ, ПлККГШ                 |
| 152        | MMVGDLLEV          | РЭМ, ПлККГШ                                   |
| 153        | FISERVEVV          | МРЛ, РЭМ                                      |
| 154        | RLLGTEFQV          | МРЛ                                           |
| 155        | LLNPVVEFV          | НМРЛ, ГКК, РМЖ, КРК, ПлККГШ                   |
| 157        | TLTSLLAQA          | НМРЛ, КРК, ПлККГШ                             |
| 229        | AILAHLNTV          | РЭМ, ПлККГШ                                   |
| 230        | KLQNIMMLL          | ПлККГШ                                        |
| 233        | HLFDAFVSV          | МЕЛ                                           |

| SEQ ID No. | Последовательность | Презентация пептидов при раковых заболеваниях                             |
|------------|--------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| 234        | LLSPHNPAL          | ГБ, ГКК, МРЛ, РЭМ, МЕЛ, ПКК                                               |
| 235        | KIIDFLSAL          | НМРЛ, ГКК, МЕЛ, ПлККГШ                                                    |
| 236        | STIAILNSV          | МЕЛ                                                                       |
| 237        | ALAPHLDDA          | МРЛ, ОМЛ                                                                  |
| 238        | GLYERPTAA          | РЖ, ККМ, РП, КРК, НХЛ                                                     |
| 239        | KMNESTRSV          | ГБ, КРК                                                                   |
| 240        | YMGECKLIASV        | РЭМ, НХЛ                                                                  |
| 243        | FMADDIFSV          | МРЛ                                                                       |
| 244        | YLLEKNRVV          | ПлККГШ                                                                    |
| 245        | SLLDLPLSL          | НМРЛ, ПКК, ОМЛ, ПлККГШ                                                    |
| 247        | ALYEGYATV          | ОМЛ, ПлККГШ                                                               |
| 248        | YLDRFLAGV          | МРЛ, ПлККГШ                                                               |
| 249        | GLCERLVSL          | МЕЛ, НХЛ, ПлККГШ                                                          |
| 250        | SLAPATPEV          | РМЖ, ПлККГШ                                                               |
| 252        | RLMEICESL          | РЭМ, МЕЛ                                                                  |
| 253        | ALAEIDNSL          | НМРЛ, ОМЛ                                                                 |
| 254        | KLQGKLP EL         | РЭМ, ОМЛ                                                                  |
| 255        | SLLHFTENL          | НМРЛ, КРК                                                                 |
| 257        | GLYTDPCGV          | ПлККГШ                                                                    |
| 259        | ILLPRIIEA          | ГБ, РЖ, ХЛЛ, МРЛ, РЭМ, РМЖ, МЕЛ, КРК, РПЖ, ПлККГШ                         |
| 260        | ILLEKILSL          | РЖ, ГКК, РПрЖ, ХЛЛ, РЯ, МРЛ, РЭМ, РМЖ, РЖП_ХК, МЕЛ, РПЖ, ОМЛ, НХЛ, ПлККГШ |
| 261        | QLQDRVYAL          | МЕЛ                                                                       |
| 262        | FMVDKAIYL          | РЭМ, МЕЛ, ПлККГШ                                                          |
| 263        | VLLSEQGDVKL        | РЭМ, ОМЛ                                                                  |
| 266        | YAIGLVMRL          | ГКК, РЖП_ХК, МЕЛ                                                          |
| 305        | KLFTSVFGV          | ОМЛ                                                                       |
| 306        | ALLSSLNEL          | ОМЛ, РПрЖ, РМЖ, РЖП_ХК, ГКК, НХЛ, НМРЛ, РЯ, ГБ, ПКК, РМП, РЭМ             |

Таблица 14А: Сводка данных презентации выбранных опухолеассоциированных пептидов, связывающихся с молекулами HLA-A\*24, настоящего изобретения по видам заболеваний.

ГБ = глиобластома, ГКК = гепатоклеточная карцинома, НМРЛ = немелкоклеточный рак легких, РПрЖ = рак предстательной железы, РЖ = рак желудка, КРК = колоректальный рак, ПКК = почечноклеточная карцинома.

| SEQ ID No. | Последовательность | Презентация пептидов при раковых заболеваниях |
|------------|--------------------|-----------------------------------------------|
| 158        | HYSQELSLLYL        | ГБ, РЖ, НМРЛ, ГKK, РПрЖ, ПKK                  |
| 159        | LYNKGFIYL          | ГБ, НМРЛ, ПKK                                 |
| 160        | VYTL DIPVL         | РЖ, НМРЛ, ГKK, РПрЖ                           |
| 161        | IYLVSIPEL          | РЖ, НМРЛ, РПрЖ                                |
| 162        | VFTRVSSFL          | ГБ, РЖ, НМРЛ                                  |
| 163        | DYLGKGLASF         | ГБ, РЖ, НМРЛ                                  |
| 164        | KFSSFSLFF          | РЖ, НМРЛ, РПрЖ                                |
| 165        | DYTTWTALL          | РЖ, НМРЛ                                      |
| 166        | YYVESGKLF          | ГБ, НМРЛ, ГKK                                 |
| 167        | NYINRILKL          | РЖ                                            |
| 168        | KYQDILETI          | НМРЛ, РПрЖ                                    |
| 169        | AYTLIAPNI          | РЖ, НМРЛ, ГKK                                 |
| 170        | VYEDQVGKF          | ГБ, НМРЛ                                      |
| 171        | LFIPSSKLLFL        | НМРЛ, ГKK, ПKK                                |
| 172        | TYTTVPRVAF         | ГБ, ПKK                                       |
| 173        | IYSWILDHF          | РЖ, НМРЛ, ГKK, ПKK                            |
| 174        | VYVGGGQIIHL        | ГБ, РЖ, НМРЛ                                  |
| 175        | YYEVHKELF          | РЖ, НМРЛ, ГKK                                 |
| 176        | EYNQWFTKL          | РЖ, НМРЛ                                      |
| 177        | VYPWLGALL          | РЖ                                            |
| 178        | IFIEVFSHF          | РЖ, НМРЛ                                      |
| 179        | MYDSYWRQF          | ГБ, НМРЛ                                      |
| 180        | IYDDSFIRPVT        | НМРЛ, ГKK                                     |
| 181        | LYLDIINLF          | РЖ, НМРЛ, РПрЖ                                |
| 182        | IYQLDTASI          | РЖ, НМРЛ, РПрЖ                                |
| 183        | VFTSTARAF          | НМРЛ, РПрЖ                                    |
| 184        | VFQNFPLLF          | ГБ, РЖ                                        |
| 185        | IYKVGAPTI          | НМРЛ                                          |
| 186        | IFPQFLYQF          | РЖ, НМРЛ                                      |
| 187        | TYLRDQHFL          | РЖ, НМРЛ, ГKK                                 |
| 188        | RYFKGLVF           | ГБ                                            |
| 189        | WYVNGVNYF          | НМРЛ, РПрЖ                                    |
| 190        | GFFIFNERF          | НМРЛ, РПрЖ                                    |
| 191        | VFKASKITF          | ГБ                                            |
| 192        | SYALLTYMI          | НМРЛ                                          |
| 193        | RFHPTPLLL          | НМРЛ, ГKK, РПрЖ                               |
| 194        | EFGSLHLEFL         | ГБ                                            |
| 195        | TYSVSFPMF          | ГБ, РЖ, НМРЛ, ГKK, РПрЖ                       |
| 196        | LYIDRPLPYL         | РЖ, НМРЛ, ГKK, РПрЖ, ПKK                      |

| SEQ ID No. | Последовательность | Презентация пептидов при раковых заболеваниях |
|------------|--------------------|-----------------------------------------------|
| 197        | EYSLFPGQVVI        | ГБ, РЖ, НМРЛ, ГKK, РПрЖ                       |
| 198        | LYLDKATLI          | ГБ, РЖ, НМРЛ, ГKK, РПрЖ                       |
| 199        | RYAEEVGIF          | РЖ, НМРЛ, ГKK, РПрЖ                           |
| 200        | YYGPSLFL           | РЖ, НМРЛ, ПKK                                 |
| 201        | IYATEAHVF          | ГБ, РЖ, НМРЛ, ГKK, РПрЖ                       |
| 202        | VYWDSAGAAHF        | НМРЛ                                          |
| 203        | FYSRLLQKF          | РЖ, НМРЛ                                      |
| 204        | TYELRYFQI          | РЖ, НМРЛ                                      |
| 205        | VHIPEVYLI          | РЖ, НМРЛ                                      |
| 206        | EYQENFLSF          | НМРЛ, РПрЖ                                    |
| 207        | AYVVFVSTL          | ГБ, РЖ, НМРЛ                                  |
| 208        | TYTQDFNKF          | НМРЛ, ГKK                                     |
| 209        | TYKDEGNDYF         | ГБ, НМРЛ                                      |
| 210        | IYTMIRNL           | ГБ, РЖ, НМРЛ                                  |
| 211        | YYLEVGTKLI         | РЖ, НМРЛ, ГKK                                 |
| 212        | YYTFHFLYF          | РЖ, НМРЛ, ГKK                                 |
| 213        | IFDEAEKL           | НМРЛ, РПрЖ                                    |
| 214        | LYLKLWNLI          | НМРЛ, ГKK                                     |
| 215        | YFDKVVTL           | НМРЛ, ГKK                                     |
| 216        | QYSSVFKSL          | ГБ, РЖ                                        |
| 217        | FFPPTRQMGLLF       | РЖ                                            |
| 218        | YYKSTSSAF          | ГБ, РЖ, НМРЛ, ГKK, РПрЖ                       |
| 219        | EYPLVINTL          | ГБ, РЖ, НМРЛ, ГKK, ПKK                        |
| 220        | GYIDNVTLI          | РЖ, НМРЛ, ГKK                                 |
| 221        | RYSTGLAGNLL        | ГБ, НМРЛ, ГKK, РПрЖ                           |
| 222        | TFSVSSHFLF         | ГБ, НМРЛ, ГKK                                 |
| 223        | KYIPYKYVI          | НМРЛ, ГKK                                     |
| 224        | QYLENLEKL          | ГБ, НМРЛ, ГKK                                 |
| 225        | YYVYIMNHL          | ГБ, НМРЛ                                      |
| 226        | VYRDETGEFLF        | ГБ, НМРЛ, ГKK, РПрЖ                           |
| 227        | IFLDYEAGTLSF       | РЖ, ПKK                                       |
| 228        | KYTSWYVAL          | ГБ, РПрЖ                                      |
| 267        | KYMVYPQTF          | ГБ, РЖ, НМРЛ, ГKK, РПрЖ                       |
| 268        | QYLGQIQHI          | РЖ, НМРЛ                                      |
| 269        | YFIDSTNLKTHF       | РЖ, НМРЛ, ГKK                                 |
| 270        | NYYEVHKELF         | ГБ, РЖ, НМРЛ                                  |
| 271        | LYHDIFSRL          | РЖ, НМРЛ, ГKK                                 |
| 272        | QYLQDAYSF          | ГБ, НМРЛ                                      |
| 273        | TYIKPISKL          | ГБ, НМРЛ                                      |

| SEQ ID No. | Последовательность | Презентация пептидов при раковых заболеваниях |
|------------|--------------------|-----------------------------------------------|
| 274        | AYLHSHALI          | НМРЛ, РПрЖ                                    |
| 275        | EYINQGDLEHF        | НМРЛ, РПрЖ                                    |
| 276        | VYGFQWRHF          | НМРЛ                                          |
| 277        | VYQGHTALL          | ГБ, РЖ, НМРЛ, РПрЖ                            |
| 278        | RYISDQLFTNF        | ГБ, РЖ, НМРЛ, ГКК, РПрЖ, ПКК                  |
| 279        | TYIESASEL          | НМРЛ, ПКК                                     |
| 280        | RYPDNLKHLYL        | РЖ, НМРЛ, ГКК                                 |
| 281        | PYRLIFEKF          | НМРЛ, ГКК                                     |
| 282        | KFVDSTFYL          | РЖ, НМРЛ                                      |
| 283        | TYGDAGLTYTF        | ГБ, РЖ, НМРЛ, РПрЖ, ПКК                       |
| 284        | RYLNKAFHI          | РПрЖ                                          |
| 285        | HYPPVQVLF          | ГБ, РЖ, НМРЛ, ГКК, РПрЖ                       |
| 286        | RYPDNLKHL          | НМРЛ, ГКК, РПрЖ                               |
| 287        | LYITEPKTI          | РЖ, НМРЛ                                      |
| 288        | VYVSDIQEL          | РЖ, НМРЛ, ГКК, РПрЖ                           |
| 289        | KYPVEWAKF          | РПрЖ, ПКК                                     |
| 295        | YYPGVILGF          | ГБ, НМРЛ, ПКК                                 |
| 296        | TYVDSSHTI          | ГБ, РЖ, НМРЛ, ГКК, РПрЖ                       |
| 297        | PFLQASPHF          | РЖ, НМРЛ                                      |
| 298        | RYLEGTSCI          | РЖ, НМРЛ                                      |
| 299        | VYFVAPAKF          | РЖ, НМРЛ                                      |
| 300        | AYVLRLETI          | ГБ, РЖ, НМРЛ, ПКК                             |
| 301        | AYKPGALTF          | НМРЛ, ГКК                                     |
| 302        | RYMPPAHRNF         | РЖ, НМРЛ                                      |

В Таблице 14Б представлена презентация выбранных пептидов при дополнительных видах раковых заболеваний и, таким образом, особая значимость упомянутых пептидов для диагностики и/или лечения указанных видов рака.

Таблица 14Б: Сводка данных презентации выбранных опухолеассоциированных пептидов, связывающихся с молекулами HLA-A\*24, настоящего изобретения по видам заболеваний.

ГБ = глиобластома, ГКК = гепатоклеточная карцинома, НМРЛ = немелкоклеточный рак легких, РПрЖ = рак предстательной железы, РЖ = рак желудка, КРК = колоректальный рак, ПКК = почечноклеточная карцинома.

| SEQ ID No. | Последовательность | Презентация пептидов при раковых заболеваниях |
|------------|--------------------|-----------------------------------------------|
| 162        | VFTRVSSFL          | ГКК                                           |
| 163        | DYLGGLASF          | РПpЖ                                          |
| 164        | KFSSFSLFF          | РПpЖ                                          |
| 167        | NYINRILKL          | HMPЛ                                          |
| 178        | IFIEVFSHF          | ГКК                                           |
| 180        | IYDDSFIRPVTf       | ГКК                                           |
| 184        | VFQNFPLLF          | HMPЛ                                          |
| 206        | EYQENFLSF          | ГБ                                            |
| 212        | YYTFHFLYF          | РПpЖ                                          |
| 216        | QYSSVFKSL          | HMPЛ, ГКК                                     |
| 218        | YYKSTSSAF          | MPЛ                                           |
| 227        | IFLDYEAGTLSF       | HMPЛ                                          |

Таблица 15: Показатели презентации: В таблице представлены пептиды, связывающиеся с HLA-A\*02, которые специфически презентуются на опухолях (++++), 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 (+).

ГБ = глиобластома (N = 41), РМЖ= рак молочной железы (N = 17), КРК = колоректальный рак (N = 28), ПКК = почечноклеточная карцинома (N = 20), ХЛЛ = хронический лимфоцитарный лейкоз (N = 17), ГКК = гепатоклеточная карцинома (N = 16), НМРЛ= немелкоклеточный рак легких (N = 90), МРЛ = мелкоклеточный рак легких (N = 19), НХЛ = неходжкинская лимфома (N = 18), ОМЛ = острый миелоидный лейкоз (N = 18), РЯ = рак яичника (N = 20), РПЖ = рак поджелудочной железы (N = 16), РПрЖ = рак предстательной железы и доброкачественная гиперплазия предстательной железы (N = 39), РП = рак пищевода, в том числе рак пищеводно-желудочного перехода (N = 17), РЖП\_ХК = аденокарцинома желчного пузыря и холангиокарцинома (N = 6), МЕЛ = меланома (N = 7), РЖ = рак желудка (N = 29), РМП = рак мочевого пузыря (N = 16), РМ = рак матки (N = 15). Панель нормальных тканей (N = 262), рассматриваемых как подходящие для сравнения с опухолями, состояла из: жировой ткани, надпочечной железы, артерии, вены, костного мозга, головного мозга, центрального и периферического нерва, глаза, толстой кишки, прямой кишки, тонкой кишки, включая двенадцатиперстную кишку, пищевода, желчного пузыря, сердца, почки, печени, легкого, лимфатического узла, мононуклеарных лейкоцитов, поджелудочной железы, брюшины, гипофиза, плевры, слюнной железы, скелетной мышцы, кожи, селезенки, желудка, вилочковой железы, щитовидной железы, трахеи, мочеточника, мочевого пузыря.

| SEQ ID No. | ОМЛ  | РМЖ  | ХЛЛ  | КРК  | ГБ   | РЖП_ХК | РЖ   | ГКК  | МЕЛ  | НХЛ  | НМРЛ | РЯ   | РП   | РПЖ  | РПрЖ | ПКК  | МРЛ  | РМП  | РЭМ  |
|------------|------|------|------|------|------|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1          |      |      |      |      | ++++ |        |      |      |      |      | ++++ | ++++ |      |      |      |      |      |      |      |
| 2          |      |      |      | ++++ | ++++ | ++++   | ++++ |      |      |      | ++++ |      |      | ++++ |      | ++++ |      | ++++ |      |
| 3          |      |      |      |      |      |        |      |      |      | +    |      |      |      |      |      |      |      | +++  |      |
| 5          | ++   |      | +    |      |      |        |      |      |      |      |      | +    |      |      |      |      |      |      |      |
| 6          |      |      |      |      | ++++ |        |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 7          | ++   |      | +    |      |      |        |      |      | +    |      |      |      | +++  |      |      |      |      |      |      |
| 8          | ++++ |      | ++++ |      |      | ++++   |      |      |      | ++++ | ++++ |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 9          |      |      |      | ++++ |      | ++++   |      |      |      |      | ++++ |      | ++++ |      |      |      |      |      |      |
| 10         | ++   |      |      |      |      |        |      |      |      |      | +    |      |      |      |      |      |      |      | +    |
| 11         |      | +++  | +++  |      |      | +++    | +++  |      |      | +++  | +++  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 12         |      |      |      |      | ++++ |        |      |      |      |      | ++++ |      |      |      |      | ++++ |      |      | ++++ |
| 13         |      | ++++ |      |      |      | ++++   | ++++ |      |      |      | ++++ | ++++ |      |      |      |      | ++++ |      |      |
| 14         | ++++ |      |      |      |      |        |      | ++++ |      | ++++ | ++++ |      | ++++ |      |      |      |      | ++++ |      |
| 15         |      | ++++ | ++++ |      |      | ++++   |      |      |      |      | ++++ |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 16         |      |      | ++++ |      |      |        |      | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 17         |      |      |      |      |      |        | ++++ |      |      | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |      |      |      |      |      |      |
| 18         |      | ++++ |      | ++++ |      |        |      |      | ++++ |      | ++++ |      | ++++ |      |      | ++++ |      | ++++ |      |
| 19         |      | ++++ |      |      | ++++ |        |      |      | ++++ | ++++ |      | ++++ | ++++ |      |      |      |      |      | ++++ |
| 20         |      |      | ++++ |      |      |        |      |      |      | ++++ |      |      |      |      |      |      |      | ++++ |      |
| 21         |      | ++++ |      |      | ++++ |        |      |      |      | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |      |      |      |      |      |      |
| 22         |      | ++++ |      |      |      |        | ++++ | ++++ |      |      |      | ++++ | ++++ |      |      |      |      | ++++ |      |
| 23         | ++   |      |      | ++   |      |        |      |      |      |      | +    |      | +    |      |      | +    |      | +++  |      |
| 24         |      |      |      |      |      |        |      | ++++ | ++++ |      | ++++ |      | ++++ |      |      |      |      |      |      |
| 25         |      |      |      |      |      |        |      |      |      |      |      | ++++ |      |      |      |      |      |      | ++++ |
| 26         | ++++ | ++++ |      |      |      | ++++   |      |      | ++++ | ++++ |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 27         |      |      |      | ++++ |      |        |      |      |      |      | ++++ | ++++ | ++++ |      |      |      |      |      | ++++ |
| 28         |      |      |      |      |      |        |      |      |      | ++++ | ++++ | ++++ |      |      |      |      |      | ++++ |      |

| SEQ ID No. | ОМЛ  | РМЖ  | ХЛЛ  | КРК  | ГБ   | РЖЛ_ХК | РЖ   | ГКК | МЕЛ  | НХЛ  | НМРЛ | РЯ   | РП   | РПЖ | РПрЖ | ПКК | МРЛ  | РМП  | РЭМ |
|------------|------|------|------|------|------|--------|------|-----|------|------|------|------|------|-----|------|-----|------|------|-----|
| 29         | +++  | +++  | +++  |      |      | +++    |      |     |      | +++  | +++  |      |      |     |      |     |      |      |     |
| 30         |      | +++  |      |      |      |        |      |     | +++  |      |      | +++  |      |     | +++  |     | +++  | +++  |     |
| 31         |      |      |      |      | ++++ |        |      |     |      |      |      |      |      |     |      |     |      |      |     |
| 32         |      |      | ++++ |      |      |        |      |     |      |      |      | ++++ |      |     |      |     |      |      |     |
| 33         |      |      |      |      |      |        | ++++ |     |      | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |     |      |     |      |      |     |
| 34         | ++++ |      |      |      |      |        |      |     |      | ++++ |      | ++++ |      |     |      |     | ++++ |      |     |
| 35         | +    |      | ++   |      |      |        |      |     |      |      | +    | +++  |      |     |      |     |      |      |     |
| 36         |      |      |      |      |      |        |      |     | ++++ |      |      |      |      |     |      |     | ++++ |      |     |
| 37         | ++++ |      |      |      |      |        |      |     |      |      |      |      |      |     |      |     |      |      |     |
| 38         | ++++ |      | ++++ |      |      |        |      |     |      | ++++ |      |      |      |     |      |     |      |      |     |
| 39         |      | ++++ |      |      |      |        |      |     |      |      |      |      |      |     |      |     |      |      |     |
| 40         |      |      |      |      |      |        |      |     |      | ++++ |      | ++++ |      |     |      |     |      |      |     |
| 41         |      |      |      |      | ++++ |        |      |     |      |      |      |      |      |     |      |     |      |      |     |
| 42         |      |      |      | ++++ |      | ++++   |      |     |      |      | ++++ |      |      |     |      |     |      |      |     |
| 43         | ++++ |      |      |      |      |        | ++++ |     |      |      |      |      | ++++ |     |      |     |      |      |     |
| 44         | ++++ |      |      |      |      |        |      |     | ++++ | ++++ | ++++ |      |      |     |      |     |      |      |     |
| 45         | ++++ |      |      |      |      | ++++   |      |     |      | ++++ |      | ++++ |      |     |      |     |      |      |     |
| 46         |      |      |      |      |      |        | ++++ |     |      |      | ++++ |      | ++++ |     |      |     |      | ++++ |     |
| 47         |      |      | ++++ |      |      |        |      |     |      | ++++ | ++++ | ++++ |      |     |      |     |      |      |     |
| 48         |      |      |      |      |      |        | ++++ |     |      |      | ++++ | ++++ | ++++ |     |      |     |      |      |     |
| 49         |      |      | ++++ |      |      |        |      |     |      | ++++ | ++++ |      |      |     |      |     |      | ++++ |     |
| 50         |      | ++++ |      |      |      |        |      |     |      |      | ++++ | ++++ |      |     |      |     |      | ++++ |     |
| 51         |      |      |      |      | ++++ |        |      |     |      |      | ++++ |      |      |     |      |     |      |      |     |
| 52         |      |      |      |      |      |        | ++++ |     |      |      | ++++ | ++++ | ++++ |     |      |     |      |      |     |
| 53         | +++  |      | +++  |      |      |        |      |     |      | +++  |      |      |      |     |      |     |      |      |     |
| 54         | +++  |      |      |      |      |        |      |     |      | +++  | +++  |      |      |     | +++  |     |      |      |     |
| 55         | +++  | +++  |      |      |      |        |      |     |      |      |      | +++  |      |     | +++  |     |      |      |     |

| SEQ ID No. | ОМЛ  | РМЖ  | ХЛЛ  | КРК  | ГБ   | РЖП_ХК | РЖ   | ГКК | МЕЛ | НХЛ  | НМРЛ | РЯ   | РП   | РПЖ | РПрЖ | ПКК  | МРЛ  | РМЛ | РЭМ  |
|------------|------|------|------|------|------|--------|------|-----|-----|------|------|------|------|-----|------|------|------|-----|------|
| 56         |      |      |      |      |      |        |      |     |     | ++++ | ++++ | ++++ |      |     |      |      |      |     |      |
| 57         |      |      |      |      |      |        |      |     |     | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |     |      |      |      |     |      |
| 58         |      |      |      |      | ++++ |        |      |     |     |      |      |      |      |     |      |      |      |     |      |
| 59         |      |      |      |      | ++++ |        |      |     |     |      | ++++ |      |      |     |      |      |      |     |      |
| 60         | ++++ |      |      |      |      |        |      |     |     |      |      |      |      |     |      |      |      |     |      |
| 61         |      |      |      |      |      |        | ++++ |     |     |      | ++++ |      | ++++ |     |      |      |      |     |      |
| 62         |      |      |      |      | ++++ |        |      |     |     |      | ++++ |      |      |     |      | ++++ |      |     |      |
| 63         |      |      |      |      |      |        | ++++ |     |     |      | ++++ |      | ++++ |     |      |      |      |     |      |
| 64         |      |      |      |      |      |        |      |     |     |      |      |      |      |     | ++++ |      |      |     |      |
| 65         |      |      |      |      |      |        | ++++ |     |     |      | ++++ |      | ++++ |     |      |      |      |     |      |
| 66         |      | ++++ |      |      |      |        |      |     |     |      | ++++ |      |      |     |      |      | ++++ |     | ++++ |
| 67         | +++  |      | +++  |      |      |        |      |     |     |      | +++  |      |      |     |      | +++  |      |     |      |
| 68         |      |      |      | ++++ |      |        | ++++ |     |     |      |      |      | ++++ |     |      |      |      |     |      |
| 69         | ++++ |      |      |      |      |        |      |     |     | ++++ |      |      |      |     |      |      |      |     |      |
| 70         |      |      |      |      |      |        |      |     |     | ++++ |      |      |      |     |      | ++++ |      |     |      |
| 71         |      |      | ++++ |      |      |        |      |     |     | ++++ |      |      |      |     |      |      |      |     |      |
| 72         |      |      |      |      |      |        |      |     |     |      |      | ++++ |      |     |      | ++++ |      |     |      |
| 73         |      |      |      |      |      |        |      |     |     |      | ++++ | ++++ | ++++ |     |      |      |      |     |      |
| 74         | ++++ |      |      |      |      |        |      |     |     |      |      |      |      |     |      |      |      |     |      |
| 75         |      |      |      |      |      |        | ++++ |     |     |      | ++++ |      | ++++ |     |      |      |      |     |      |
| 76         |      |      |      |      |      |        | ++++ |     |     |      |      |      | ++++ |     |      |      |      |     |      |
| 77         |      |      |      |      |      |        |      |     |     |      | ++++ | ++++ |      |     |      |      | ++++ |     |      |
| 78         |      |      |      |      |      |        | ++++ |     |     |      |      | ++++ | ++++ |     |      |      |      |     |      |
| 79         |      |      |      |      |      |        | ++++ |     |     |      | ++++ |      | ++++ |     |      |      |      |     |      |
| 80         | ++++ |      |      |      |      |        |      |     |     | ++++ | ++++ |      |      |     |      |      |      |     |      |
| 81         |      |      |      |      |      |        | ++++ |     |     |      | ++++ |      | ++++ |     |      |      |      |     |      |
| 82         |      |      |      |      |      |        | ++++ |     |     |      | ++++ |      | ++++ |     |      |      |      |     |      |

[illegible]

| SEQ ID No. | ОМЛ  | РМЖ | ХЛЛ  | КРК | ГБ   | РЖП_ХК | РЖ   | ГКК | МЕЛ | НХЛ  | НМРЛ | РЯ   | РП   | РПЖ | РПрЖ | ПКК  | МРЛ | РМП  | РЭМ  |
|------------|------|-----|------|-----|------|--------|------|-----|-----|------|------|------|------|-----|------|------|-----|------|------|
| 111        |      |     |      |     |      |        | ++++ |     |     |      | ++++ |      | ++++ |     |      |      |     |      |      |
| 112        |      |     |      |     |      |        |      |     |     |      | ++++ |      |      |     |      |      |     |      | ++++ |
| 113        |      |     |      |     |      |        | ++++ |     |     |      |      |      | ++++ |     |      |      |     | ++++ |      |
| 114        |      |     |      |     |      |        |      |     |     |      |      | ++++ |      |     |      | ++++ |     |      |      |
| 115        |      |     |      |     |      |        |      |     |     |      | ++++ | ++++ |      |     |      |      |     |      |      |
| 116        |      |     |      |     |      |        |      |     |     | ++++ |      |      |      |     |      |      |     | ++++ |      |
| 117        |      |     |      |     |      |        |      |     |     |      | +    |      |      |     |      |      |     |      |      |
| 118        |      |     |      |     |      |        |      |     |     |      |      | ++++ |      |     |      |      |     |      |      |
| 119        |      |     |      |     |      |        |      |     |     |      | ++++ | ++++ |      |     |      |      |     |      |      |
| 120        |      |     |      |     |      |        | ++++ |     |     |      |      |      | ++++ |     |      |      |     |      |      |
| 121        |      |     | ++++ |     |      |        |      |     |     |      |      |      |      |     |      |      |     |      |      |
| 122        |      |     |      |     |      |        | ++++ |     |     |      | ++++ |      | ++++ |     |      |      |     |      |      |
| 123        |      |     |      |     |      |        |      |     |     |      |      | ++++ |      |     |      |      |     | ++++ |      |
| 124        |      |     |      |     |      |        |      |     |     |      | ++++ | ++++ |      |     |      |      |     |      |      |
| 125        |      |     |      |     | ++++ |        |      |     |     |      |      |      |      |     | ++++ |      |     |      |      |
| 126        |      |     | ++++ |     |      |        |      |     |     |      | ++++ |      |      |     |      |      |     |      |      |
| 127        |      |     |      |     |      |        |      |     |     |      | ++++ |      |      |     |      |      |     |      |      |
| 128        |      |     |      |     |      |        | ++++ |     |     |      |      |      | ++++ |     |      |      |     |      |      |
| 129        | ++++ |     |      |     |      |        |      |     |     |      | ++++ |      |      |     |      |      |     |      |      |
| 130        |      |     |      |     |      |        |      |     |     |      |      |      |      |     |      |      |     | ++++ |      |
| 131        |      |     | ++++ |     |      |        |      |     |     | ++++ |      |      |      |     |      |      |     |      |      |
| 132        |      |     | ++++ |     |      |        |      |     |     | ++++ |      |      |      |     |      |      |     |      |      |
| 133        |      |     |      |     |      |        |      |     |     |      |      |      |      |     | ++++ |      |     |      |      |
| 134        |      |     |      |     |      |        |      |     |     |      | ++++ | ++++ |      |     |      |      |     |      |      |
| 135        |      |     | ++++ |     |      |        |      |     |     |      | ++++ |      |      |     |      |      |     |      |      |
| 136        |      |     |      |     |      |        |      |     |     | ++++ |      | ++++ |      |     |      |      |     |      |      |
| 137        |      |     |      |     | +++  |        |      |     |     |      | +++  |      |      |     |      |      |     |      |      |

| SEQ ID No. | ОМЛ  | РМЖ  | ХПЛ  | КРК  | ГБ   | РЖП_ХК | РЖ  | ГКК  | МЕЛ | НХЛ  | НМРЛ | РЯ   | РП   | РПЖ | РПрЖ | ПКК  | МРЛ  | РМП  | РЭМ  |
|------------|------|------|------|------|------|--------|-----|------|-----|------|------|------|------|-----|------|------|------|------|------|
| 138        | +++  | +    | +++  | ++   |      |        | +++ |      | ++  | +    | +    | +    |      |     |      | ++   |      | +    |      |
| 139        | +++  |      | +    |      |      |        |     |      |     |      |      |      |      |     |      |      |      |      | +    |
| 140        | ++   |      | ++   |      |      | +      |     |      |     | +    |      | +    |      |     |      |      |      |      | +++  |
| 141        | ++   |      | +    |      |      |        |     |      |     |      |      |      |      |     |      |      |      |      |      |
| 142        |      |      |      |      |      |        |     |      |     |      | +++  |      |      |     | +    |      |      |      |      |
| 143        |      |      |      |      | +    | +      |     | +    |     |      | +    |      |      |     |      |      |      |      |      |
| 144        | +++  | +    |      | +    | +++  |        | ++  |      |     |      | ++   |      | +++  |     |      |      |      |      |      |
| 145        | ++   |      |      |      |      |        |     |      |     |      | +    | +++  | +    |     |      |      |      |      |      |
| 146        |      |      |      |      |      |        |     |      |     |      |      |      |      |     | +++  |      |      |      | +    |
| 147        |      |      |      |      |      | +++    |     |      |     |      |      | +++  |      |     |      |      |      |      |      |
| 148        |      |      |      |      | +++  |        |     |      |     |      |      |      |      |     |      |      |      |      |      |
| 149        |      |      |      |      |      |        |     |      |     | ++++ |      |      |      |     |      |      |      |      |      |
| 150        |      |      | ++   | ++   |      |        |     |      | +   | +    |      |      | +    |     |      |      |      |      |      |
| 151        |      |      |      |      |      |        | +   |      |     |      |      | ++   | +    |     |      | +    |      |      |      |
| 152        | +++  |      | +++  | +++  | +++  |        |     |      |     | +    | +++  |      |      |     |      |      |      |      |      |
| 153        |      |      | +    |      |      |        |     |      |     | ++   |      | ++   | +    |     |      |      |      | +    |      |
| 154        |      |      |      |      |      |        |     |      | +   |      |      |      |      |     |      |      |      |      |      |
| 155        |      |      | +++  |      |      | ++     |     |      |     | +    |      |      |      |     |      |      |      |      |      |
| 156        |      |      |      |      |      |        |     |      |     |      |      |      |      | ++  |      |      |      |      |      |
| 157        |      |      |      |      |      |        |     |      |     |      |      |      |      |     |      |      |      | +    |      |
| 229        | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |        |     | ++++ |     | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |     |      |      | ++++ | ++++ |      |
| 230        | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |      | ++++   |     | ++++ |     | ++++ | ++++ |      |      |     |      | ++++ |      | ++++ |      |
| 231        |      |      | +    |      |      |        |     |      |     |      |      |      |      |     |      |      |      |      |      |
| 232        |      |      |      | +    |      |        |     | ++   |     |      |      |      |      |     |      |      | ++   |      |      |
| 233        | ++++ | ++++ |      | ++++ |      |        |     |      |     | ++++ | ++++ |      |      |     |      |      |      | ++++ |      |
| 234        |      | ++++ | ++++ |      |      |        |     |      |     | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |     |      |      |      | ++++ |      |
| 235        | ++++ |      |      |      |      |        |     |      |     | ++++ |      | ++++ |      |     |      |      |      |      | ++++ |

| SEQ ID No. | ОМЛ  | РМЖ  | ХЛЛ  | КРК | ГБ   | РЖП_ХК | РЖ   | ГКК  | МЕЛ  | НХЛ  | НМРЛ | РЯ   | РП   | РПЖ | РПрЖ | ПКК | МРЛ | РМП  | РЭМ  |
|------------|------|------|------|-----|------|--------|------|------|------|------|------|------|------|-----|------|-----|-----|------|------|
| 236        |      |      | ++++ |     | ++++ |        | ++++ |      |      | ++++ | ++++ |      | ++++ |     | ++++ |     |     |      |      |
| 237        |      | ++++ |      |     | ++++ |        |      | ++++ | ++++ |      | ++++ | ++++ |      |     |      |     |     | ++++ | ++++ |
| 238        | ++   |      |      |     |      |        |      |      |      |      |      |      |      |     |      |     |     |      |      |
| 239        |      |      |      |     |      | ++++   |      |      |      | ++++ | ++++ |      |      |     |      |     |     |      |      |
| 240        |      |      | ++   |     |      |        |      |      | +    |      | +    |      |      |     |      |     |     | +    |      |
| 241        |      |      |      |     |      |        |      |      |      | ++++ | ++++ | ++++ |      |     |      |     |     |      |      |
| 242        | ++++ |      |      |     |      |        |      |      |      |      | ++++ |      |      |     |      |     |     |      | ++++ |
| 243        |      |      |      |     |      |        |      |      |      | ++++ |      |      |      |     |      |     |     |      |      |
| 244        |      |      |      |     |      |        |      |      |      |      | ++++ | ++++ | ++++ |     |      |     |     |      |      |
| 245        |      |      | ++++ |     |      |        |      |      |      | ++++ |      |      |      |     |      |     |     |      |      |
| 246        |      |      | ++++ |     | ++++ |        |      |      |      |      | ++++ |      |      |     |      |     |     |      |      |
| 247        |      | ++   |      |     |      |        |      |      |      |      |      |      | +    |     |      |     | +   | +++  |      |
| 248        | +    |      |      |     |      |        |      |      |      |      |      |      |      |     |      |     |     |      |      |
| 249        |      |      | +    | +++ | ++   |        |      |      |      |      | +    |      |      |     |      | +++ |     |      |      |
| 251        | ++++ |      |      |     |      |        |      |      |      |      |      |      |      |     |      |     |     |      |      |
| 252        | ++++ |      |      |     |      |        |      |      |      |      |      |      |      |     |      |     |     |      |      |
| 253        |      |      | ++++ |     |      |        |      |      |      |      |      |      |      |     |      |     |     |      |      |
| 254        |      |      |      |     |      |        |      |      |      | ++++ | ++++ |      |      |     |      |     |     |      |      |
| 255        | ++++ |      |      |     |      |        |      |      |      | ++++ |      |      |      |     |      |     |     |      |      |
| 256        |      |      |      |     |      |        |      |      | ++++ | ++++ |      |      |      |     |      |     |     |      |      |
| 257        |      |      |      |     |      |        |      |      |      | ++++ | ++++ |      |      |     |      |     |     |      |      |
| 258        |      |      |      |     |      |        |      | ++++ |      |      |      |      |      |     | ++++ |     |     |      |      |
| 259        |      |      |      |     |      |        |      |      |      |      | ++++ | ++++ |      |     |      |     |     |      |      |
| 260        |      |      |      | ++  |      |        |      |      |      |      | +++  |      |      |     |      |     |     |      |      |
| 261        |      |      |      | +   |      |        |      |      |      | +    | +    | +    |      |     |      |     |     |      |      |
| 262        |      | +    |      | ++  |      | +      |      |      |      | +++  | +++  |      |      |     | +    |     | +++ |      |      |
| 263        |      |      | +    |     |      |        |      |      | +    | +    | +++  |      | +    |     |      |     |     |      |      |

| SEQ ID No. | ОМЛ | РМЖ | ХЛЛ | КРК | ГБ   | РЖП_ХК | РЖ | ГКК | МЕЛ | НХЛ | НМРЛ | РЯ | РП | РПЖ | РПрЖ | ПКК | МРЛ | РМП | РЭМ |
|------------|-----|-----|-----|-----|------|--------|----|-----|-----|-----|------|----|----|-----|------|-----|-----|-----|-----|
| 264        | +   |     | +   |     |      |        |    |     |     |     | +    |    |    |     |      |     |     |     |     |
| 265        |     |     | +   |     | +++  |        |    |     |     |     |      |    |    |     |      |     |     |     |     |
| 266        | +++ |     | +   |     |      |        |    |     |     |     |      |    |    |     |      |     |     |     |     |
| 290        |     | ++  |     |     |      |        |    |     | ++  |     |      |    |    |     |      |     |     |     |     |
| 291        | ++  |     |     |     | +    |        |    | +   | +++ | ++  |      | ++ |    |     |      |     | +   |     | +++ |
| 292        |     |     |     | +++ | +++  | +++    |    |     |     | ++  | +++  |    |    |     |      |     |     |     | +++ |
| 293        |     |     |     |     | ++++ |        |    |     |     |     |      |    |    |     |      |     |     |     |     |
| 294        |     |     |     |     |      |        |    |     |     |     |      |    |    |     | ++++ |     |     |     |     |

Таблица 16: Показатели презентации: В таблице представлены пептиды, связывающиеся с HLA-A\*24, которые специфически презентуются на опухолях (++++), 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 (+).

ГБ = глиобластома (N = 18), ГКК = гепатоклеточная карцинома (N = 15), НМРЛ = немелкоклеточный рак легких (N = 91), РПрЖ = рак предстательной железы (N = 40), РЖ = рак желудка (N = 44), ПКК = почечноклеточная карцинома (N = 2). В панель нормальных тканей (N = 70), рассматриваемых как подходящие для сравнения с опухолями, входили: надпочечная железа, головной мозг, толстая кишка, прямая кишка, сердце, почки, печень, легкие, поджелудочная железа, гипофиз, кожа, селезенка, желудок и вилочковая железа.

| SEQ ID No. | ГБ   | РЖ   | ГКК  | НМРЛ | РПрЖ | ПКК  |
|------------|------|------|------|------|------|------|
| 158        | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| 159        | ++++ |      |      | ++++ |      | ++++ |
| 160        |      | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |      |
| 161        |      | ++++ |      | ++++ | ++++ |      |
| 162        | ++++ | ++++ |      | ++++ |      |      |
| 163        | ++++ | ++++ |      | ++++ |      |      |
| 164        |      | ++++ |      | ++++ | ++++ |      |
| 165        |      | ++++ |      | ++++ |      |      |
| 166        | ++++ |      | ++++ | ++++ |      |      |
| 167        |      | ++++ |      |      |      |      |
| 168        |      |      |      | ++++ | ++++ |      |
| 169        |      | ++++ | ++++ | ++++ |      |      |
| 170        | ++++ |      |      | ++++ |      |      |
| 171        |      |      | +++  | +++  |      | +++  |
| 172        | ++++ |      |      |      |      | ++++ |
| 173        |      | ++++ | ++++ | ++++ |      | ++++ |
| 174        | ++++ | ++++ |      | ++++ |      |      |
| 175        |      | ++++ | ++++ | ++++ |      |      |
| 176        |      | ++++ |      | ++++ |      |      |
| 177        |      | ++++ |      |      |      |      |

| SEQ ID<br>No. | ГБ   | РХ   | ГК   | НМР<br>Г | РПРХ | ПК |
|---------------|------|------|------|----------|------|----|
| 178           |      | ++++ |      | ++++     |      |    |
| 179           | ++++ |      |      | ++++     |      |    |
| 180           |      |      | ++++ | ++++     |      |    |
| 181           |      | ++++ |      | ++++     | ++++ |    |
| 182           |      | ++++ |      | ++++     | ++++ |    |
| 183           |      |      |      | ++++     | ++++ |    |
| 184           | ++++ | ++++ |      |          |      |    |
| 185           |      |      |      | ++++     |      |    |
| 186           |      | ++++ |      | ++++     |      |    |
| 187           |      | ++++ | ++++ | ++++     |      |    |
| 188           | ++++ |      |      |          |      |    |
| 189           |      |      |      | ++++     | ++++ |    |
| 190           |      |      |      | ++++     | ++++ |    |
| 191           | ++++ |      |      |          |      |    |
| 192           |      |      |      | ++++     |      |    |
| 193           |      |      | ++++ | ++++     | ++++ |    |
| 194           | ++++ |      |      |          |      |    |
| 195           | +++  |      |      | +        |      |    |
| 196           |      |      | +    |          |      | +  |
| 197           |      | +    |      |          | +    |    |
| 198           |      | ++   | ++   | +        |      |    |
| 199           |      | +    |      |          | ++   |    |
| 200           |      | +    |      | +        |      |    |
| 201           | +++  | +    |      | ++       |      |    |
| 202           |      |      |      | +        |      |    |
| 203           |      | +    |      |          |      |    |
| 204           | ++   | +++  | +    | +++      |      |    |
| 207           | +++  | +++  |      |          |      |    |
| 208           |      |      | +    | +++      |      |    |
| 209           | +++  |      |      | +        |      |    |
| 210           | +++  | +    |      |          |      |    |
| 211           |      | +++  |      |          |      |    |
| 212           |      | +++  | +++  | +++      |      |    |
| 213           |      |      |      | ++       | +++  |    |
| 214           |      |      | ++++ | ++++     |      |    |
| 215           |      |      | ++++ | ++++     |      |    |
| 216           | ++++ | ++++ |      |          |      |    |
| 217           |      | ++++ |      |          |      |    |
| 218           | ++   | +    |      | ++       |      |    |

| SEQ ID<br>No. | ГБ   | РХ   | ГК   | ИМР<br>Д | РПРХ | ПК   |
|---------------|------|------|------|----------|------|------|
| 219           | +++  |      | +    | +        |      | ++   |
| 222           |      |      | +    | +        |      |      |
| 224           | +    |      | +    | +        |      |      |
| 225           |      |      |      | ++       |      |      |
| 227           |      | +++  |      |          |      | +++  |
| 228           | ++   |      |      |          | +    |      |
| 267           | +++  | +++  | +++  | +++      | +++  |      |
| 268           | ++++ | ++++ | ++++ | ++++     |      |      |
| 269           |      | ++++ | ++++ | ++++     |      |      |
| 270           | ++++ | ++++ |      | ++++     |      |      |
| 271           |      | ++++ | ++++ | ++++     |      |      |
| 272           | ++++ |      |      | ++++     |      |      |
| 273           | ++++ |      |      | ++++     |      |      |
| 274           |      |      |      | ++++     | ++++ |      |
| 275           |      |      |      | ++++     | ++++ |      |
| 276           |      |      |      | ++++     |      |      |
| 277           |      | ++   |      | +++      | +    |      |
| 278           | +    | ++   |      |          |      |      |
| 279           |      |      |      |          |      | +++  |
| 280           |      |      | +    |          |      |      |
| 281           |      |      | +++  | +++      |      |      |
| 282           | +++  | +++  | +++  | +++      |      |      |
| 283           | +    | ++   |      | +++      | +++  | +++  |
| 284           |      |      |      |          | ++++ |      |
| 285           | +    |      |      | +        |      |      |
| 286           |      |      | ++   | +        |      |      |
| 287           | +    | +    |      |          |      |      |
| 288           |      | +    | +    | +        |      |      |
| 289           |      |      |      |          | +++  | +++  |
| 295           | ++++ |      |      | ++++     |      | ++++ |
| 296           |      |      |      |          |      |      |
| 297           |      | +++  |      | +++      |      |      |
| 298           | +    |      |      | +++      |      |      |
| 299           |      |      |      | ++       |      |      |
| 300           | +++  | +++  |      | +++      |      | +++  |
| 301           |      |      | ++++ | ++++     |      |      |
| 302           |      | ++++ |      | ++++     |      |      |

## 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.

Для пептидов по изобретению, связывающихся с молекулами HLA I класса, экспрессия в нормальных тканях всех исходных генов минимальна, как было показано, руководствуясь данными банка данных о последовательностях РНК (RNASeq), охватывающего прикл. 3000 образцов нормальных тканей (Lonsdale, 2013). Более того, чтобы оценить целевой охват в различных видах опухолей, были проанализированы данные об экспрессии генов и экзонов в опухолях по сравнению с нормальными тканями.

### 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:

компаний Asterand (Детройт, Мичиган, США и Ройстон, Хартфордшир, Великобритания), BioCat GmbH (Гейдельберг, Германия), BioServe (Белтсвилль, Мэриленд, США), Geneticist Inc. (Глендейл, Калифорния, США), Istituto Nazionale Tumori «Pascale» (Неаполь, Италия), ProteoGenex Inc. (Кальвер-Сити, Калифорния, США), Университетской клиники г. Гейдельберг (Гейдельберг, Германия)

Суммарная РНК опухолевых тканей для экспериментов RNASeq была получена из:

компаний Asterand (Детройт, Мичиган, США и Ройстон, Хартфордшир, Великобритания); Bio-Options Inc. (Бри, Калифорния, США); BioServe (Белтсвилль, Мэриленд, США); Центра иммунотерапии рака (CCIT), Клиники Херлев (Херлев, Дания); Geneticist Inc. (Глендейл, Калифорния, США); Istituto Nazionale Tumori «Pascale» (Неаполь, Италия); Медицинского университета префектуры Киото (KPU) (Киото, Япония); Медицинского центра Лейденского университета (LUMC) (Лейден, Нидерланды); Tissue Solutions Ltd (Глазго, Великобритания); Университетской клиники г. Бонн (Бонн, Германия); Университетской клиники г. Женевы (Женева, Швейцария); Университетской клиники г. Гейдельберг (Гейдельберг, Германия); Осацкого городского университета (OCU) (Осака, Япония); Университетской клиники г. Тюбинген (Тюбинген, Германия); Университетской клиники Валь д'Хеброн (Барселона, Испания).

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 одиночные 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 различных видов рака, представлены на Фигуре 2. Данные об экспрессии для различных видов заболеваний и дополнительных типичных пептидах сведены в Таблицу 17, информация основана на данных, полученных с помощью сравнения опухолевых образцов из исследовательской сети TCGA (Атлас ракового генома): (<http://cancergenome.nih.gov/>.) с образцами нормальной ткани (Lonsdale, 2013). Показатели экспрессии дополнительных типичных генов показаны в Таблице 18 на основании собственных данных, полученных в ходе анализа RNASeq.

Таблица 17: Целевой охват при различных опухолевых заболеваниях относительно экспрессии исходных генов выбранных пептидов:

Ген рассматривали как экспрессируемый в избытке, если уровень его экспрессии в опухолевом образце был более чем в два раза выше наивысшего 75-ого перцентиля уровней экспрессии, определенных для образцов нормальных тканей с высоким и средним уровнем риска. Избыточная экспрессия обозначена как «А» ( $\geq 50\%$  опухолей выше порогового значения), «В» ( $\geq 20\%$  опухолей выше порогового значения, но  $< 50\%$ ) и «С» ( $\geq 5\%$  опухолей выше порогового значения, но  $< 20\%$ ).

УКМП=уротелиальная карцинома мочевого пузыря (N=408), РМЖ=рак молочной железы (N=1104), ХОЛ=холангиокарцинома (N=36), АДТК=аденокарцинома толстой и прямой кишки (N=462), ДВКЛ=лимфоидное новообразование диффузная В-крупноклеточная лимфома (N=48), РаПи=рак пищевода (N=185), МГБ=мультиформная глиобластома (N=169), ХКП=хромофобный рак почки (N=66), СККП=светоклеточная карцинома почки (N=534), ППККП=папиллярная почечноклеточная карцинома почки (N=291), ОМЛ = острый миелоидный лейкоз (N=173), ГНС3=глиома низкой степени злокачественности (N=534), ГККП=гепатоклеточная карцинома печени (N=374), АКЛ=аденокарцинома легких (N=517), ПлККЛ=плоскоклеточная карцинома легких (N=503), СЦКЯ=серозная цистаденокарцинома яичника (N=309), ПАКПЖ=протоковая аденокарцинома поджелудочной железы (N=179), АПрЖ=аденокарцинома предстательной железы (N=498), АДПК=аденокарцинома толстой и прямой кишки (N=167), МК=меланома кожи (N=473), АКЖ=аденокарцинома желудка (N=415), ЭКТМ=эндометриоидная карцинома тела матки (N=546).

| SEQ ID No. | PMЖ | УКМП | ХОЛ | АДТК | ДВКЛ | РаПи | МГБ | ХКП | СККП | ППККП | ОМЛ | ГНСЗ | ГККП | АКЛ | ПлККЛ | СЦКЯ | ПАКПЖ | АПРЖ | АДПК | МК | АКЖ | ЭКМ |
|------------|-----|------|-----|------|------|------|-----|-----|------|-------|-----|------|------|-----|-------|------|-------|------|------|----|-----|-----|
| 1          |     |      |     |      |      |      | A   |     |      |       |     | A    |      |     |       |      |       |      |      |    |     |     |
| 2          | C   | C    | B   | A    |      | A    |     | A   | A    | A     |     |      | B    | A   | A     |      | B     |      | A    | B  | B   | C   |
| 3          | A   | B    | B   | C    | A    | A    | A   | B   | A    | B     | A   | A    | C    | B   | A     | C    | C     | B    | C    | A  | B   | B   |
| 4          |     | C    |     |      |      | C    |     |     |      |       |     |      |      |     | B     | C    |       |      |      |    |     | B   |
| 5          | B   |      |     | C    | B    | B    |     |     |      |       | A   |      |      | C   | B     | C    |       | B    | C    |    | A   | C   |
| 6          |     |      |     |      |      |      | A   |     |      |       |     | A    |      |     |       |      |       |      |      |    |     |     |
| 7          | A   | A    | A   | A    | A    | A    | A   | A   | A    | A     | C   | A    | A    | A   | A     | A    | A     | A    | A    | A  | A   | A   |
| 8          | B   | A    | C   | B    | A    | B    | B   |     |      |       | B   | C    | C    | C   | B     | C    |       |      | B    | A  | C   | B   |
| 9          | B   | C    |     | C    |      | B    |     |     |      |       |     |      |      | C   | C     |      | B     |      | C    | C  | C   |     |
| 10         | C   |      |     |      |      | B    |     |     |      |       | A   |      |      |     | C     | C    |       |      |      | B  | C   |     |
| 11         | B   | C    |     |      | C    | B    |     |     | C    | B     | A   |      |      | C   |       | B    |       |      |      | C  | B   | C   |
| 12         | A   | A    | A   | A    | B    | A    | A   | A   | A    | A     | A   | A    | B    | A   | A     | A    | A     | A    | A    | A  | A   | A   |
| 13         |     |      |     |      |      |      |     |     |      |       |     |      |      | C   | C     |      |       |      |      |    |     |     |
| 14         | B   | B    |     | B    | C    | B    | C   |     |      |       | A   | C    | C    | C   | B     | C    |       |      | B    | B  | C   | C   |
| 15         | C   | C    |     |      |      | C    | C   |     |      |       |     |      |      | C   | C     | B    | C     |      |      | C  | C   |     |
| 16         | A   | B    | C   | B    | B    | A    | C   |     |      |       | A   | C    | C    | B   | A     | A    |       | C    | B    | B  | A   | C   |
| 17         |     |      |     |      |      |      |     |     |      |       | A   |      |      |     |       |      |       |      |      |    |     |     |
| 18         | C   | C    |     |      |      | B    |     |     | B    | C     | C   |      |      | C   | A     | C    | C     |      |      | B  |     |     |
| 19         | C   |      |     |      | B    | B    | C   | C   | B    | C     | A   | C    |      |     |       | C    |       |      |      | C  | B   |     |
| 20         | B   |      |     |      |      | A    |     |     | C    |       | A   | B    |      |     | C     |      |       | C    |      | C  | B   |     |
| 21         | A   | A    | C   | A    | A    | A    | A   |     |      |       | A   | C    | C    | B   | A     | A    | C     |      | A    | A  | A   | B   |
| 22         | C   |      |     | C    |      | B    |     |     |      |       |     |      |      |     |       | C    |       |      | C    |    | C   |     |
| 23         | B   | B    | B   | C    |      | A    |     | C   | B    | B     | A   |      |      | C   | C     | C    | C     | B    |      | B  | A   |     |
| 24         | C   | B    |     | C    |      | C    | C   |     |      |       |     |      | B    | B   | B     | C    |       | C    | C    | A  | C   | C   |
| 25         | C   | C    |     |      |      |      |     |     |      |       |     |      |      | C   |       | A    | C     |      |      |    |     | A   |
| 26         |     |      |     |      |      | B    |     | C   |      |       | A   |      |      |     | C     |      |       |      |      |    |     |     |
| 27         | B   | B    | C   | A    |      | B    | C   |     | C    | B     | B   |      |      | B   | A     | A    | C     | A    | A    | B  | B   | B   |

| SEQ ID No. | PMЖ | УКМП | ХОЛ | АДТК | ДВКЛ | РаПи | МГБ | ХКП | СККП | ППККП | ОМЛ | ГНСЗ | ГККП | АКЛ | ПлККЛ | СЦКЯ | ПАКПЖ | АПРЖ | АДПК | МК | АКЖ | ЭКМ |
|------------|-----|------|-----|------|------|------|-----|-----|------|-------|-----|------|------|-----|-------|------|-------|------|------|----|-----|-----|
| 28         |     |      |     |      |      | С    |     |     |      |       |     |      |      |     | С     |      |       |      |      | В  |     |     |
| 29         | A   | A    | A   | A    | A    | A    | A   | A   | A    | A     | В   | A    | A    | A   | A     | A    | A     | A    | A    | A  | A   | A   |
| 30         | A   | В    | A   | A    | A    | В    | A   | A   | A    | A     | A   | A    | A    | A   | A     | В    | A     | A    | A    | A  | A   | A   |
| 31         |     |      |     |      |      |      | С   |     |      |       |     | A    |      |     |       |      |       |      |      |    |     |     |
| 32         | В   | С    | В   |      | В    | В    |     |     | В    | В     | В   |      | С    | В   | A     | A    |       |      |      | A  | В   | A   |
| 33         | В   | В    | A   | В    | A    | A    | С   |     | В    | В     |     | С    | В    | A   | В     | В    | С     | С    | С    | В  | В   | В   |
| 34         | В   |      |     | С    |      | A    |     | С   | В    | С     | A   | В    |      | С   | С     | В    | С     | С    | С    | В  | A   | С   |
| 35         |     |      |     |      |      | С    |     |     |      |       | A   |      |      |     |       |      |       |      |      |    |     |     |
| 36         |     |      |     |      |      |      |     |     |      |       |     |      |      |     |       |      |       |      |      | A  |     |     |
| 37         |     |      |     |      |      |      |     |     |      |       | A   |      |      |     |       |      |       |      |      |    |     | С   |
| 38         |     |      |     |      |      |      |     |     |      |       | A   |      |      |     |       |      |       |      |      |    |     |     |
| 39         | A   |      |     |      |      |      |     |     |      |       |     |      | С    |     |       |      |       | В    |      | С  |     |     |
| 40         |     |      |     |      | A    |      |     |     | С    |       |     |      |      |     |       |      |       |      |      |    |     |     |
| 41         |     |      |     |      |      |      | С   |     |      |       |     |      |      |     |       |      |       |      |      |    |     |     |
| 42         | С   | В    | A   | A    |      | A    |     |     |      | В     |     |      |      | A   | A     | В    | A     | С    | A    |    | В   | В   |
| 43         | В   | В    | С   | В    | A    | A    | В   |     | С    |       | A   |      |      | С   | A     | В    |       |      | В    | В  | В   | В   |
| 44         | В   | С    |     | В    | В    | A    | С   |     |      |       | A   |      |      | С   | В     | С    |       |      | В    | В  | В   |     |
| 45         |     |      |     |      |      | С    |     |     |      |       | С   |      |      |     |       |      |       |      |      |    |     |     |
| 46         |     |      |     |      |      | С    |     |     |      |       |     | С    |      |     |       |      |       |      |      |    |     |     |
| 47         | В   | A    | A   | A    | A    | A    | В   | В   | С    | A     | В   | В    | В    | В   | В     | A    | В     | В    | A    | A  | A   | A   |
| 48         | С   | С    | С   | С    |      | A    |     | С   | В    | С     | A   |      |      | С   | В     | В    | С     |      | С    | С  | A   | С   |
| 49         | A   | A    | A   | A    | A    | A    | A   |     | С    | С     | A   | В    | С    | A   | A     | A    | A     | В    | A    | A  | A   | A   |
| 50         | A   | A    | A   | A    | A    | A    | A   | A   | A    | A     | A   | A    | A    | A   | A     | A    | A     | A    | A    | A  | A   | A   |
| 51         |     |      | В   | В    |      | В    | С   | В   | В    | С     |     | С    | С    | С   | С     | A    | С     | В    | В    | С  | A   | С   |
| 52         | В   | В    | В   | A    | A    | A    | A   | С   | A    | A     | A   | В    | В    | A   | A     | A    | A     |      | A    | A  | A   | С   |
| 53         |     | С    |     | В    | A    |      |     |     |      |       |     |      | С    |     | С     |      |       |      | В    |    |     | В   |
| 54         | A   | В    | A   | В    | A    | В    | A   | A   | A    | A     | A   | A    | В    | A   | В     | В    | A     | A    | В    | A  | В   | В   |

[illegible]

| SEQ ID No. | PMЖ | УКМП | ХОЛ | АДТК | ДВКЛ | РаПи | МГБ | ХКП | СККП | ППККП | ОМЛ | ГНСЗ | ГККП | АКЛ | ПлККЛ | СЦКЯ | ПАКПЖ | АПРЖ | АДПК | МК | АКЖ | ЭКМ |
|------------|-----|------|-----|------|------|------|-----|-----|------|-------|-----|------|------|-----|-------|------|-------|------|------|----|-----|-----|
| 82         | В   | В    | В   | В    | А    |      | В   |     |      |       |     |      | С    | В   | А     | С    | С     |      | В    | С  | С   | В   |
| 83         |     |      |     | С    |      | С    |     |     |      |       |     |      |      |     |       |      | С     |      | С    |    | С   |     |
| 84         |     | С    |     |      |      | С    | В   |     |      |       |     | В    |      |     | С     | В    |       |      |      | С  | С   |     |
| 85         |     |      |     |      |      |      |     |     |      |       |     |      |      |     |       | С    |       |      |      |    |     | В   |
| 86         |     |      |     | С    | А    |      | В   |     |      | В     |     | С    | С    |     |       | В    |       |      | С    |    |     |     |
| 87         |     | С    | С   | С    |      | В    |     | В   | С    | В     | В   |      |      |     | С     |      |       |      | С    |    | С   | С   |
| 88         | С   | В    |     | С    |      | С    | В   | В   |      | С     |     | А    |      |     |       | С    |       | В    | С    | С  | С   | В   |
| 89         | А   | А    | А   | А    | А    | А    | А   | А   | А    | А     | А   | А    | А    | А   | А     | А    | А     | А    | А    | А  | А   | А   |
| 90         |     | С    |     |      |      |      |     |     |      |       |     |      |      | С   | С     |      |       |      |      |    |     | С   |
| 91         | В   |      |     | С    | С    | А    |     | С   | С    | С     | А   | С    |      | С   | С     | В    |       | С    | С    | С  | А   | С   |
| 92         | С   | С    | С   | С    |      |      |     | В   |      | С     |     |      | С    | С   | С     | В    |       | С    | С    | С  |     | В   |
| 93         | С   | В    | С   | В    | С    | А    | В   | С   |      | С     | А   | С    | С    | С   | В     | А    |       | С    | А    | В  | В   | В   |
| 94         |     |      |     |      |      |      |     |     |      |       | В   |      |      |     |       | С    |       |      |      |    |     |     |
| 95         |     |      |     |      |      |      |     |     |      |       |     |      |      | С   | С     |      |       |      |      |    |     |     |
| 96         | В   | А    | А   | А    | А    | А    | С   | В   | С    | А     | А   |      | В    | А   | А     | А    | А     | А    | А    | В  | А   | А   |
| 97         | С   | В    |     | В    | А    | В    | С   |     |      |       |     |      |      | С   | В     | В    |       |      | В    |    | С   | В   |
| 98         |     |      |     |      |      |      |     |     |      |       | А   |      |      |     |       |      |       |      |      |    |     |     |
| 99         | С   |      |     |      |      | В    |     |     |      |       | А   |      |      |     |       |      |       |      |      |    | В   |     |
| 100        |     |      |     |      |      |      |     |     |      |       | С   |      |      |     |       |      |       |      |      |    |     |     |
| 101        |     |      |     |      |      | С    |     |     |      |       | А   |      |      |     |       |      |       |      |      |    | С   | С   |
| 102        |     |      |     |      |      |      |     |     |      |       | А   |      |      |     |       |      |       |      |      |    |     |     |
| 103        |     |      |     |      |      |      |     |     |      |       | В   |      |      |     |       |      |       |      |      |    |     |     |
| 104        |     |      |     |      |      |      | С   |     |      |       |     | А    |      |     |       |      |       |      |      |    |     |     |
| 105        |     |      |     |      | В    | С    |     |     |      |       |     | С    |      |     |       | С    |       |      |      | С  | С   |     |
| 106        | В   |      |     | В    |      | С    |     | В   |      |       | А   |      |      | В   | С     | С    |       |      | В    |    |     | В   |
| 107        |     |      |     |      | А    |      |     |     |      |       |     |      |      |     |       |      |       |      |      |    |     |     |
| 108        | С   |      |     |      |      | С    |     |     |      |       |     |      |      |     | С     | В    |       |      |      |    |     | В   |

| SEQ ID No. | PMЖ | УКМП | ХОЛ | АДТК | ДВКЛ | РаПи | МГБ | ХКП | СККП | ППККП | ОМЛ | ГНСЗ | ГККП | АКЛ | ПлККЛ | СЦКЯ | ПАКПЖ | АПрЖ | АДПК | МК | АКЖ | ЭКМ |
|------------|-----|------|-----|------|------|------|-----|-----|------|-------|-----|------|------|-----|-------|------|-------|------|------|----|-----|-----|
| 109        |     | С    |     | В    |      | В    |     |     |      |       |     |      |      | В   |       | А    | В     |      | В    |    | В   | А   |
| 110        |     |      |     |      |      |      |     |     |      |       |     |      |      |     |       |      |       |      |      |    |     |     |
| 111        | В   | С    |     | В    | В    | В    |     | С   |      |       | А   |      |      | В   | В     | А    |       | С    | В    | В  | В   | В   |
| 112        |     | В    |     |      |      |      | С   | С   | А    | С     |     |      |      | С   |       | В    |       |      |      |    |     | В   |
| 113        | А   | А    | В   | А    | А    | А    | А   |     | С    | С     | А   | А    | В    | А   | А     | А    | В     | С    | А    | А  | А   | А   |
| 114        |     |      | В   |      |      |      |     |     | А    | А     |     |      |      |     |       | А    |       |      |      |    |     | С   |
| 115        | А   | А    | А   | А    | А    | А    | А   | А   | А    | А     | А   | А    | А    | А   | А     | А    | А     | А    | А    | А  | А   | А   |
| 116        | А   | А    | С   | А    | А    | А    | А   | С   |      |       | А   | С    | С    | В   | А     | А    |       |      | А    | А  | А   | В   |
| 117        | В   | В    | А   | С    |      | С    | В   |     | А    | А     | С   |      | В    | С   | В     | С    | В     |      | С    | В  | С   | В   |
| 118        |     |      |     |      |      | С    | А   |     |      |       |     | В    |      | С   | С     | С    |       |      |      | А  | С   | С   |
| 119        | А   | В    | А   | В    | А    | В    | В   | В   | А    | А     | В   | С    | В    | А   | А     | В    | А     | В    | В    | А  | В   | В   |
| 120        | С   | С    |     | В    | В    | А    | С   | С   |      | С     | А   | В    |      | С   | В     | А    |       | С    | В    | В  | А   | В   |
| 121        | С   | В    | С   | В    | А    | В    | С   |     |      |       | С   |      | С    |     | С     | В    |       | С    | В    | В  | В   | В   |
| 122        | С   |      |     | С    |      | В    |     |     |      |       |     |      |      |     |       | С    |       |      | С    |    | С   |     |
| 123        |     |      |     | С    |      | С    |     |     |      |       |     |      |      |     |       |      | С     |      | С    |    | С   |     |
| 124        | А   | А    | А   | А    | А    | А    | А   | В   | А    | А     | В   | В    | В    | А   | А     | А    | А     | А    | А    | А  | А   | А   |
| 125        |     |      |     |      |      |      | С   |     |      |       |     |      |      |     |       |      |       |      |      | С  |     |     |
| 126        | А   | А    | А   | А    | В    | А    | А   | А   | А    | В     | А   | В    | В    | А   | А     | А    | А     | А    | А    | А  | А   | А   |
| 127        | А   | А    | А   | А    | А    | А    | А   | В   | А    | А     | В   | А    | А    | А   | А     | А    | А     | А    | А    | А  | А   | А   |
| 128        | А   | А    | В   | А    | А    | А    | С   | С   | А    | В     | А   |      | В    | А   | А     | А    | А     | В    | А    | А  | А   | А   |
| 129        |     |      |     |      | С    |      |     |     |      |       | С   |      |      |     |       |      |       |      |      |    |     |     |
| 130        | С   | С    |     | С    | С    | С    | С   |     | В    | С     |     |      |      | С   | В     | С    |       |      | С    | С  | С   |     |
| 131        | В   |      |     | С    |      | В    | С   |     | С    |       | А   | С    |      |     | С     | С    |       | С    | С    | С  | В   | С   |
| 132        |     |      | С   |      |      |      |     |     |      | С     |     |      |      |     |       |      |       |      | С    |    |     | С   |
| 133        |     |      |     |      |      |      |     |     |      |       | В   |      |      |     |       |      |       | А    |      |    |     |     |
| 135        | А   | В    | А   | А    | А    | А    | А   | А   | А    | А     | А   | А    | В    | А   | А     | А    | А     | А    | А    | А  | А   | В   |
| 136        |     |      |     |      |      |      |     |     |      |       |     |      |      | С   | С     |      |       |      |      |    |     |     |

| SEQ ID No. | PMЖ | УКМП | ХОЛ | АДТК | ДВКЛ | РаПи | МГБ | ХКП | СККП | ППККП | ОМЛ | ГНСЗ | ГККП | АКЛ | ПлККЛ | СЦКЯ | ПАКПЖ | АПРЖ | АДПК | МК | АЮЖ | ЭКМ |
|------------|-----|------|-----|------|------|------|-----|-----|------|-------|-----|------|------|-----|-------|------|-------|------|------|----|-----|-----|
| 137        | В   |      |     |      | С    | А    |     |     | В    | С     | А   | С    |      | С   | С     |      | С     | С    | С    | С  | А   |     |
| 138        | А   | В    | С   | В    | С    | А    | С   | С   | С    | С     | А   | В    |      | В   | А     | С    | С     | С    | В    | А  | А   | С   |
| 139        |     |      |     |      |      |      |     |     |      |       | А   |      |      |     |       |      |       |      |      |    |     |     |
| 140        |     |      |     |      |      |      |     |     |      |       | А   |      |      |     |       |      |       |      |      | С  |     |     |
| 141        | С   |      |     |      |      |      |     |     |      |       | А   |      |      |     |       |      |       | С    |      |    | С   |     |
| 142        |     |      |     |      |      |      | А   |     |      | С     | В   | А    |      |     |       |      |       |      |      |    |     |     |
| 144        | В   |      | С   | С    |      | В    |     |     |      |       | А   |      |      | С   |       |      | С     | В    | С    | С  | В   |     |
| 145        |     |      |     |      |      |      |     |     |      |       |     |      |      |     |       |      |       | В    |      |    |     | С   |
| 146        | С   |      |     |      |      |      |     | В   | С    |       |     |      | В    | С   |       |      |       | В    |      |    |     |     |
| 147        |     |      |     |      |      |      |     |     |      |       |     |      |      |     |       |      |       |      |      |    |     | С   |
| 148        | А   | В    | В   | В    | А    | В    | А   | С   | В    | А     | А   | А    | С    | В   | В     | А    | В     | А    | В    | А  | В   | А   |
| 149        | А   |      |     |      |      | С    |     |     |      |       |     |      |      | С   | С     | С    | С     |      |      |    |     |     |
| 150        | В   | А    | В   | В    | А    | А    | В   |     | В    | В     | А   | В    | В    | В   | В     | С    | А     | А    | В    | В  | В   | А   |
| 151        |     |      |     |      |      |      |     |     | С    |       |     |      |      |     |       |      |       |      |      |    |     |     |
| 152        | С   |      |     |      |      | В    |     |     |      |       | А   |      |      |     | С     | С    |       |      |      | С  | В   |     |
| 153        | А   | А    | А   | А    | В    | А    | А   | С   | С    | В     | В   | В    | В    | В   | А     | А    | В     | В    | А    | А  | А   | А   |
| 154        |     |      |     |      |      |      |     |     |      | С     |     |      | С    |     |       |      |       | В    |      | А  |     |     |
| 155        | А   | В    | С   | В    | С    | А    | С   | С   | С    | С     | А   | В    |      | В   | А     | В    | С     | С    | В    | А  | А   | С   |
| 156        | В   | В    | В   | В    |      | В    | С   |     | С    | В     |     |      | С    | А   | В     | В    | А     | В    | В    | А  | А   | В   |
| 157        | С   |      |     | С    |      | В    |     |     |      |       |     |      |      |     |       | С    |       |      | С    |    | С   |     |
| 229        | В   | В    |     | В    | В    | В    | В   |     |      |       | В   |      | С    | С   | В     | В    |       |      | В    | С  | В   | В   |
| 230        | В   | В    |     | В    | А    | А    | С   |     |      |       | А   |      |      | С   | В     | С    |       |      | В    | С  | В   | В   |
| 231        |     |      |     |      |      |      |     |     |      |       | А   |      |      |     |       |      |       |      |      |    |     |     |
| 232        | В   | А    | В   | А    | А    | В    | С   |     |      |       | С   |      | С    | С   | В     | В    | С     |      | А    | В  | В   | В   |
| 233        | В   | В    | А   | А    | А    | А    | В   | С   |      |       | А   | С    | С    | В   | А     | А    | С     |      | А    | В  | А   | В   |
| 234        | В   |      |     | В    | С    | С    |     | В   |      |       |     |      |      |     | С     | В    |       |      | В    | С  | В   |     |
| 235        | А   | А    | А   | А    | А    | А    | А   |     | А    | В     | А   | В    | А    | А   | А     | А    | В     | А    | А    | А  | В   | А   |

| SEQ ID No. | PMЖ | УКМП | ХОЛ | АДТК | ДВКЛ | РаПи | МГБ | ХКП | СККП | ППККП | ОМЛ | ГНСЗ | ГККП | АКЛ | ПлККЛ | СЦКЯ | ПАКПЖ | АПрЖ | АДПК | МК | АКЖ | ЭКМ |
|------------|-----|------|-----|------|------|------|-----|-----|------|-------|-----|------|------|-----|-------|------|-------|------|------|----|-----|-----|
| 236        | В   | В    |     | А    | А    | В    | В   |     |      |       | А   | С    |      | С   | В     | В    |       | А    | А    | С  | В   | В   |
| 237        | В   | В    | В   | А    | С    | А    | А   |     | С    | В     |     | С    |      | В   | В     | В    |       |      | А    | В  | В   | В   |
| 238        |     |      |     |      | С    |      |     |     |      |       | А   |      |      |     |       |      |       |      |      |    |     |     |
| 239        | В   | В    |     | А    | В    | А    | В   |     |      |       | А   | С    |      | С   | А     | В    |       |      | А    | В  | В   | В   |
| 240        | В   | В    | В   | А    | А    | В    | А   |     | В    | С     | А   | А    | С    | В   | А     | В    | С     | В    | А    | В  | В   | В   |
| 241        | А   | А    | А   | А    | А    | А    | А   | А   | А    | А     | А   | А    | А    | А   | А     | А    | А     | А    | А    | А  | А   | А   |
| 242        |     |      |     |      | С    |      | В   |     |      |       | В   |      |      | С   | С     | В    |       |      |      |    |     | В   |
| 243        |     |      |     |      | А    |      |     |     |      |       |     |      |      | С   | С     |      |       |      |      | С  | С   |     |
| 244        | В   | С    | В   | В    |      | А    |     | А   | С    | С     |     |      |      | В   | В     | А    | В     | С    | В    | А  | А   | В   |
| 245        |     |      |     |      |      | С    |     |     |      |       | А   |      |      |     |       |      |       |      |      |    | С   |     |
| 246        | А   | А    | А   | А    | А    | А    | А   | С   | А    | А     | А   | А    | В    | А   | А     | А    | А     | А    | А    | А  | А   | А   |
| 247        | В   | А    | А   | А    | А    | А    | С   | С   |      | В     | С   |      | С    | В   | А     | А    | В     | В    | А    | В  | А   | А   |
| 248        |     |      |     | С    | С    | С    | С   |     |      |       | В   | С    |      |     | С     | С    |       |      | С    |    | С   |     |
| 249        | А   | В    | С   | В    | В    | А    | С   | С   | С    | С     | А   | В    |      | В   | А     | В    | С     | С    | В    | А  | А   | С   |
| 250        |     |      |     |      | А    |      | С   | С   |      |       |     | С    |      | С   | С     |      |       |      |      | С  |     |     |
| 251        |     |      |     |      | В    |      |     |     |      |       | А   |      |      |     |       |      |       |      |      |    |     |     |
| 252        | А   | А    | А   | А    | А    | А    | А   | С   | С    | С     | А   | В    | А    | А   | А     | А    | А     | С    | А    | А  | А   | А   |
| 253        | С   |      |     |      | С    | В    |     |     |      |       | А   | С    |      |     |       |      |       | С    |      | С  | В   |     |
| 254        |     |      |     | С    | В    | С    | С   |     |      | С     | А   | С    |      |     |       | С    |       |      | С    | В  | С   | В   |
| 255        | С   |      |     | В    | В    | А    | В   |     |      |       | В   |      |      |     | С     | В    |       |      | В    | С  | А   | С   |
| 256        | В   | В    |     | А    | В    | А    | В   |     |      |       | А   | С    |      | В   | А     | В    |       |      | А    | В  | А   | В   |
| 257        |     | С    | С   | С    | С    | С    | С   |     |      |       | В   |      |      |     | С     |      | С     | С    | С    |    | С   | С   |
| 258        | А   | А    | А   | А    | А    | А    | А   | А   | А    | А     | А   | А    | А    | А   | А     | А    | А     | А    | А    | А  | А   | А   |
| 260        | С   |      |     |      |      |      |     |     |      |       |     |      |      |     |       |      |       |      | С    |    |     |     |
| 261        |     |      |     |      |      |      |     |     |      |       |     |      | С    |     |       | В    |       |      |      |    |     |     |
| 262        |     |      |     |      |      |      | С   |     |      |       |     | С    |      |     |       |      |       | С    |      |    |     |     |
| 263        | С   |      |     | С    | С    | В    |     |     |      |       | А   |      |      | С   | С     |      |       |      | С    |    | С   |     |

| SEQ ID No. | PMЖ | УКМП | ХОЛ | АДТК | ДВКЛ | РаПи | МГБ | ХКП | СККП | ППККП | ОМЛ | ГНСЗ | ГККП | АКЛ | ПлККЛ | СЦКЯ | ПАКПЖ | АПРЖ | АДПК | МК | АКЖ | ЭКМ |
|------------|-----|------|-----|------|------|------|-----|-----|------|-------|-----|------|------|-----|-------|------|-------|------|------|----|-----|-----|
| 264        | A   | A    | A   | A    | A    | A    | A   | A   | A    | A     | A   | A    | A    | A   | A     | A    | A     | A    | A    | A  | A   | A   |
| 265        | A   | A    | A   | A    | A    | C    | A   | A   | C    | A     | C   | A    | B    | A   | A     | A    | A     | A    | A    | A  | B   | A   |
| 266        | C   | C    |     |      | B    | C    |     |     |      |       | A   |      |      | C   |       | B    |       |      |      |    | C   |     |
| 290        | A   | A    | B   | A    | A    | A    | B   |     |      |       | A   | C    | C    | B   | A     | A    | C     |      | A    | A  | A   | A   |
| 291        | A   | B    | C   | A    | B    | A    | B   |     |      |       | A   | C    | C    | B   | A     | C    | C     |      | A    | B  | A   | B   |
| 292        | A   | A    | A   | A    | B    | A    | A   | A   | A    | A     | A   | A    | C    | A   | A     | A    | A     | A    | A    | A  | A   | A   |
| 293        |     |      |     |      |      |      | B   |     |      |       |     | B    |      |     |       |      |       |      |      | C  |     |     |
| 294        |     |      | C   |      |      |      | C   |     |      | C     |     |      | B    | C   |       |      |       | A    |      | C  |     |     |
| 158        | A   | B    | C   | B    | C    | A    | C   |     |      |       | A   | C    |      | B   | A     | C    |       | C    | B    | A  | B   | C   |
| 159        | A   | C    | C   | B    | C    | A    | C   | B   | B    | C     | A   | C    | C    | B   | A     | A    | B     | C    | B    | A  | A   | C   |
| 160        | A   | B    | C   | B    | B    | A    | C   |     |      |       | A   | C    | C    | B   | A     | A    |       | C    | B    | B  | A   | C   |
| 161        |     |      |     | C    | C    |      |     |     |      |       | A   |      |      |     |       | C    |       |      |      | C  |     |     |
| 162        |     |      |     |      |      |      |     |     |      |       | A   |      |      |     |       |      |       |      |      |    |     |     |
| 163        |     |      |     |      |      |      |     |     |      |       | A   |      |      |     |       |      |       |      |      | B  |     |     |
| 164        |     |      |     |      | A    |      |     |     | B    |       | C   |      |      |     |       |      |       |      |      | C  |     |     |
| 165        | C   | B    | C   | C    | A    | B    | C   |     |      |       | C   |      | C    | C   | B     |      |       |      | C    | C  | C   | B   |
| 166        | B   | B    | B   | A    | B    | A    | B   | B   | B    | B     | A   | B    | C    | B   | A     | B    | B     | B    | A    | A  | A   | C   |
| 167        | A   | A    | A   | A    | A    | A    | A   | A   | A    | A     | A   | A    | A    | A   | A     | A    | A     | A    | A    | A  | A   | A   |
| 168        | C   | C    |     | B    |      | C    |     | A   |      |       |     |      |      | B   | C     | A    |       | B    | C    |    | C   | B   |
| 169        | B   | B    | C   | A    | A    | A    | C   |     | B    |       | C   |      | C    | B   | B     | A    | A     |      | A    | C  | A   | C   |
| 170        | A   | A    | B   | A    | B    | A    | A   | C   | A    | B     | A   | A    | B    | A   | A     | A    | A     | A    | A    | A  | A   | A   |
| 171        | B   | C    | C   | B    | B    | B    |     | B   | C    | C     | A   | C    |      | C   | B     | C    | C     |      | A    | B  | B   | A   |
| 172        |     |      | C   |      |      |      | A   |     | C    |       |     | A    |      |     |       | C    |       |      |      |    |     |     |
| 173        |     |      |     |      |      | B    |     |     |      |       | A   | C    |      |     |       |      |       |      |      | C  | B   |     |
| 174        | C   | B    |     | A    |      | B    | B   | C   |      |       |     | C    |      |     | B     | C    |       | B    | A    |    | B   | B   |
| 175        | B   | B    | C   | B    | B    | A    | B   |     |      |       | B   | C    |      | C   | A     | B    |       |      | B    | B  | B   | C   |
| 176        |     |      | C   | C    |      | B    |     |     |      |       |     |      |      |     | C     |      |       |      | C    | C  | B   | C   |

| SEQ ID No. | PMЖ | УКМП | ХОЛ | АДТК | ДВКЛ | РаПи | МГБ | ХКП | СККП | ППККП | ОМЛ | ГНСЗ | ГККП | АКЛ | ПлККЛ | СЦКЯ | ПАКПЖ | АПрЖ | АДПК | МК | АКЖ | ЭКМ |
|------------|-----|------|-----|------|------|------|-----|-----|------|-------|-----|------|------|-----|-------|------|-------|------|------|----|-----|-----|
| 177        |     |      |     | В    |      | С    |     |     |      |       |     |      |      |     |       |      |       |      | В    |    | С   |     |
| 179        |     |      |     |      |      | В    |     |     |      |       | В   | С    |      |     | В     |      |       |      |      |    |     |     |
| 180        | А   | В    | В   | А    | С    | А    | А   | С   | В    | В     | А   | В    | В    | А   | А     | А    | В     | В    | А    | А  | А   | В   |
| 181        | А   | А    | А   | А    | А    | А    | А   | А   | А    | А     | А   | А    | А    | А   | А     | А    | А     | А    | А    | А  | А   | А   |
| 182        | В   | В    | С   | А    | В    | А    | А   |     |      |       | В   | С    | С    | В   | А     | А    |       | А    | А    | А  | В   | В   |
| 183        |     |      |     |      | С    |      |     |     |      |       | А   |      |      |     |       |      |       |      |      |    |     |     |
| 184        |     |      |     |      |      |      |     |     |      |       | С   |      |      |     |       |      |       |      |      |    |     |     |
| 185        |     |      |     |      | С    |      |     |     |      |       |     |      |      |     |       |      |       |      |      |    |     |     |
| 186        |     |      | С   | С    |      | В    |     |     | А    | В     | А   |      |      | А   |       | С    |       |      | С    | С  | А   |     |
| 187        | С   | А    | С   | В    | А    | В    | С   |     |      |       | В   |      | С    | С   | В     | А    |       |      | В    | С  | В   | А   |
| 188        |     |      |     |      |      |      | А   |     |      |       |     | А    |      |     |       |      |       |      |      |    |     |     |
| 189        |     |      | С   |      |      |      |     |     |      | С     |     |      | С    | С   |       |      |       | А    |      | С  |     |     |
| 190        |     |      |     |      |      |      |     |     | С    |       | А   |      |      |     |       |      |       | С    |      |    |     |     |
| 191        |     |      |     |      |      | С    | А   |     |      |       |     | А    |      |     | С     |      |       |      |      | С  |     |     |
| 192        | В   | В    | С   | В    | А    | В    | А   |     | В    | В     | А   | С    | С    | С   | В     | В    |       |      | В    | А  | В   | А   |
| 193        | В   | А    | В   | В    | А    | В    | С   |     |      | С     | В   |      | С    | В   | А     | А    | С     |      | В    | В  | В   | В   |
| 194        | С   | В    |     |      |      |      | А   | А   | С    | С     |     | В    | С    |     |       |      | С     | А    |      | С  | С   |     |
| 195        | С   | С    | С   |      | В    |      | А   |     | С    | С     | В   |      |      | С   | В     | А    | С     |      |      | В  |     | В   |
| 196        | А   | В    | В   | А    | В    | А    | С   | В   | А    | В     | А   | А    | В    | В   | В     | В    | В     | А    | А    | А  | А   | В   |
| 197        | В   | В    |     | А    | А    | А    | В   |     |      |       | А   |      |      | С   | А     | А    |       |      | А    | В  | А   | В   |
| 198        | В   | С    | С   | В    | В    | А    | А   |     | В    | С     | А   | В    | С    | В   | А     | А    |       | С    | А    | В  | В   | С   |
| 199        | А   | В    | С   | А    | А    | С    |     |     |      |       |     |      |      | С   | С     | С    | В     | А    | А    | В  | В   | В   |
| 200        | В   |      |     | С    |      | А    |     | С   | В    | С     | А   | В    |      | С   | С     | В    | С     | С    | С    | В  | А   | С   |
| 201        | А   | В    | В   | А    | В    | А    | В   |     | С    | С     | А   |      | С    | В   | А     | А    | С     | С    | А    | В  | А   | В   |
| 202        |     |      |     |      |      |      |     |     |      |       | С   |      |      |     |       |      |       |      |      |    |     |     |
| 203        | А   | А    | В   | А    | А    | А    | А   | С   |      | С     | А   | С    | С    | В   | А     | А    | С     | С    | А    | А  | А   | А   |
| 204        |     | С    | В   | В    | А    | С    | С   |     |      | С     |     |      | С    |     | С     | С    |       | С    | С    | С  | В   | В   |

[illegible]



| SEQ ID No. | РМЖ | УКМП | ХОЛ | АДТК | ДВКЛ | РаПи | МГБ | ХКП | СККП | ППККП | ОМЛ | ГНСЗ | ГККП | АКЛ | ПлККЛ | СЦКЯ | ПАКПЖ | АПРЖ | АДПК | МК | АКЖ | ЭКМ |
|------------|-----|------|-----|------|------|------|-----|-----|------|-------|-----|------|------|-----|-------|------|-------|------|------|----|-----|-----|
| 302        | В   | В    | С   | В    | А    | В    |     | С   | А    |       |     |      |      | А   | А     | А    | С     | С    | В    | В  | В   | А   |

Таблица 18: 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 (+).

ОМЛ = острый миелоидный лейкоз (N= 11), ХЛЛ = хронический лимфоцитарный лейкоз (N= 10), КРК = колоректальный рак (N= 20), ГБ = глиобластома (N= 24), РЖП\_ХК = аденокарцинома желчного пузыря и холангиокарцинома (N= 3), РЖ = рак желудка (N= 11), ГКК = гепатоклеточная карцинома (N= 15), НХЛ = неходжкинская лимфома (N= 10), НМРЛ = мелкоклеточный рак легких (N= 11), РЯ = рак яичника (N= 12), РП = рак пищевода, в том числе рак пищеводно-желудочного перехода (N= 11), РПЖ = рак поджелудочной железы (N= 26), РПрЖ = рак предстательной железы и доброкачественная гиперплазия предстательной железы (N= 5), ПКК = почечноклеточная карцинома (N= 10), МРЛ = мелкоклеточный рак легких (N= 10), РМП = рак мочевого пузыря (N= 10), РЭМ = рак матки (N= 10). 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, желчный пузырь, сердце, почка, печень, легкие, лимфатический узел, поджелудочная железа, гипофиз, прямая кишка, скелетная мышца, кожа, тонкая кишка, селезенка, желудок, щитовидная железа, трахея, мочевой пузырь и вена.

| SEQ ID No. | ОМЛ | РМЖ | ХЛЛ | КРК | ГБ  | РЖП_Х<br>К | РЖ | ГКК | НХЛ | НМРЛ | РЯ  | РП  | РГЖ | РПРЖ | ПКК | МРЛ | РМП | РЭМ |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|------------|----|-----|-----|------|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|
| 1          |     |     |     |     | +++ |            |    |     |     |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 2          |     |     |     | +   | +   | +++        | ++ | +   |     | +++  | +   |     | +   |      | +++ |     |     | +   |
| 4          |     |     |     |     | ++  |            |    |     |     | ++   | +++ | +++ |     |      |     | +   |     | ++  |
| 5          | +   |     | +   |     |     |            |    |     | +   |      | +   |     |     |      |     | +   |     |     |
| 6          |     |     |     |     | +++ |            |    |     |     |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 8          |     |     |     |     | +   |            |    |     | +   | +    | +   | +   |     |      |     | +   |     | +   |
| 9          |     | +++ |     | +   |     | +++        | ++ |     |     | ++   | +   | +++ | ++  |      |     |     | +   | ++  |
| 10         | +++ |     | +   |     | +   |            |    |     |     | +    | +   | +   |     |      |     | +   | ++  |     |
| 11         |     | +   |     |     |     |            |    |     | +   | +    | ++  | +   | +   |      |     | +   |     |     |
| 12         |     |     |     |     | +   |            |    |     |     |      | +   | +   |     |      |     |     |     |     |
| 13         |     | +   |     |     |     |            | +  |     |     |      | +   |     |     |      |     | +   |     |     |
| 14         | +   | +++ |     | ++  | ++  | +          | +  | +   | ++  | ++   | +   | ++  | +   |      |     | +++ | +   | +   |
| 15         |     | +   | +   |     |     | +          |    |     |     | +    |     | +   | +   |      |     |     |     |     |
| 16         |     | +   |     | +   |     | +          |    |     | +   | +    | ++  | +   |     |      |     | +++ |     |     |
| 17         |     |     | +   |     |     |            |    |     |     |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 18         |     |     |     |     |     | ++         | +  |     |     | ++   |     | +++ |     |      | +   |     |     |     |
| 19         |     |     |     |     | +   |            |    |     | +   |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 20         |     | +   | +   |     | +   |            |    |     | +   | +    | +   |     |     |      |     | +   |     | +   |
| 21         | +   | +   |     | +   | +   | +          | +  |     | +++ | +    | +   | +   | +   |      |     | ++  | +   | +   |
| 22         |     | ++  |     | +   |     | +++        | ++ |     |     | +    | +++ | +++ | +   |      |     | +   | ++  |     |
| 23         |     |     |     |     |     | +          |    |     |     | +    |     |     | +   | +    |     |     | +++ | +   |
| 24         |     | +++ |     |     | +++ |            |    | +++ |     | +++  |     | +++ | +   |      |     | +++ |     |     |
| 25         |     |     |     |     |     |            |    |     |     |      | +++ |     | +   |      |     |     |     | ++  |
| 26         | +   |     |     |     | +   |            |    |     | ++  |      | +   | +   |     |      |     | +   |     |     |
| 27         | +   | ++  |     | +++ |     | +          | +  |     | +   | +    | +++ | +++ | +   |      | ++  | +   | +   | +   |
| 28         |     |     |     |     |     |            |    |     |     | ++   | +   | +++ |     |      |     |     | ++  |     |
| 29         |     |     |     |     | +   |            |    |     |     |      |     | +   |     |      |     |     |     |     |

[illegible]

| SEQ ID No. | ОМЛ | РМЖ | ХЛЛ | КРК | ГБ  | РЖП_Х<br>К | РЖ  | ГКК | НХЛ | НМРЛ | РЯ  | РП  | РГЖ | РПрЖ | ПКК | МРЛ | РМП | РЭМ |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|
| 59         |     |     |     |     | +++ |            |     |     | +   | +++  |     | +++ |     |      |     |     | +   |     |
| 60         | +++ |     |     |     |     |            |     |     |     |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 61         |     | +   |     |     | +   | +          |     |     | +   | +    | ++  | +   |     |      |     | +++ |     | +   |
| 62         |     |     |     | +   | ++  | ++         | ++  | +   |     | +++  | +   |     | +   |      | +++ |     | +   |     |
| 63         |     | +   | +   |     | +   | +          |     |     |     | +    | +   | +   |     |      | +   | +   | +   | +   |
| 64         |     |     |     |     |     |            |     |     |     | +    |     |     |     | +++  |     |     |     |     |
| 65         |     |     |     |     | +   |            |     |     | +   |      | +++ | ++  |     |      |     |     | +   | +   |
| 67         | ++  |     | ++  |     |     |            |     |     | ++  |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 68         |     |     |     | +++ |     | +          | ++  |     |     |      | ++  | +++ | +++ |      |     |     | +++ | ++  |
| 69         | +   |     |     |     |     |            |     |     |     |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 70         |     |     |     |     |     |            |     |     | +   |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 71         | +   |     |     |     | +   |            |     |     |     |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 72         | +++ | +   |     |     |     |            |     |     |     |      | +++ |     |     |      | +++ |     |     | +++ |
| 73         | +   |     |     |     |     |            |     |     |     |      |     | +   |     |      |     |     |     |     |
| 74         | +++ |     |     |     |     |            |     |     | ++  |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 75         |     | +   |     | +   | +   | +          |     |     | +   | +    | ++  | +   |     |      |     | +++ | +   | +   |
| 76         |     | +   | +   |     | +   |            |     |     | +   | +    | +   |     |     |      |     |     |     |     |
| 78         | +   |     |     |     | +   |            |     |     |     |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 79         |     | +   | +   |     |     |            |     | +   |     |      |     | +   |     |      |     |     |     |     |
| 80         | +   |     |     |     |     |            |     |     |     |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 81         |     |     |     |     |     |            |     | +   |     |      | +   |     |     |      |     |     |     |     |
| 82         |     | +   |     |     |     |            |     |     | ++  |      | +   | +   |     |      |     |     |     | +   |
| 83         |     |     |     | ++  |     | +          | +++ |     |     | +    | +   | +   | +++ |      |     |     | +++ |     |
| 84         |     |     |     |     | +   |            |     |     |     |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 85         |     |     | +   |     |     |            |     |     |     |      | +++ |     |     |      |     |     |     | +++ |
| 86         |     |     |     |     | +   |            |     |     | +   |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 90         |     | +   |     |     |     |            |     |     |     | +    | ++  | +   |     |      |     | +++ | +++ | +   |

| SEQ ID No. | ОМЛ | РМЖ | ХЛЛ | КРК | ГБ  | РЖП_Х<br>К | РЖ | ГКК | НХЛ | НМРЛ | РЯ  | РП  | РГЖ | РПрЖ | ПКК | МРЛ | РМП | РЭМ |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|------------|----|-----|-----|------|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|
| 91         |     |     | +   |     | +   |            |    |     | +   | +    | +   |     |     |      |     | +   |     |     |
| 93         |     |     |     | +   |     |            |    |     |     | +    | +   |     |     |      |     | +   |     |     |
| 94         | ++  |     |     |     |     |            |    |     |     | +    | +   |     | +   |      |     | +   |     | ++  |
| 95         |     | +   |     |     |     |            | +  |     |     |      | +   |     |     |      |     | +   |     |     |
| 96         |     |     |     |     |     |            |    |     |     |      |     | +   |     |      |     |     |     |     |
| 97         | +   | +   | +   | +   | +   |            | +  |     | +++ | +    | ++  | ++  |     |      |     | +++ | +   |     |
| 98         |     |     |     |     |     |            |    |     |     |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 99         | +   |     | +++ |     | +   | +          | +  |     | +   | +    | +   |     | +   | +    |     | ++  |     | +   |
| 100        |     |     |     |     |     |            |    | +++ |     |      |     |     | ++  | +++  |     |     |     | +   |
| 101        | +++ |     |     |     |     |            |    |     |     |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 102        | +++ |     |     |     |     |            |    |     |     |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 104        |     |     |     |     | +++ |            |    |     |     |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 105        |     |     | +++ |     | +++ |            |    |     | +++ |      | +++ |     |     |      |     | +   | +++ |     |
| 106        | +++ | +++ | +   | +++ | +   |            |    | +   | +++ | +++  | +++ | ++  | +++ |      |     | +++ |     | ++  |
| 107        |     |     | +   |     |     |            |    |     | +++ |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 108        |     | +++ |     |     |     |            |    | +++ |     |      | +++ |     |     |      |     |     |     | +++ |
| 109        |     |     |     |     |     | +++        | +  |     |     |      | +++ | +++ | +   |      |     |     |     | +++ |
| 111        | +++ | +   | ++  |     | +   |            |    |     | +++ | ++   | ++  | +   |     |      |     | ++  |     |     |
| 112        |     |     |     |     |     |            |    |     |     |      | +   |     | +   |      | +++ |     | +   | +   |
| 113        | +   |     |     |     | +   |            |    |     | +   | +    | +   | +   |     |      |     | ++  | +   |     |
| 114        |     |     |     |     |     |            |    |     |     |      | +++ |     |     |      | +++ |     |     |     |
| 115        |     |     |     |     | +   |            |    |     |     |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 116        |     | +   |     | +   | +   |            |    |     | +   | ++   | +   | +   |     |      |     | ++  | +   |     |
| 117        |     |     |     |     |     | +          |    |     |     |      |     | +   | +   |      | +   | +   |     |     |
| 118        |     |     |     |     | +   |            |    |     |     |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 119        |     |     | +   |     |     |            |    |     | +   |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 120        | +   |     |     |     | +   |            |    |     | +   | +    | +   | +   |     |      |     | +   |     |     |

| SEQ ID No. | ОМЛ | РМЖ | ХЛЛ | КРК | ГБ  | РЖП_Х<br>К | РЖ  | ГКК | НХЛ | НМРЛ | РЯ  | РП  | РГЖ | РПРЖ | ГКК | МРЛ | РМП | РЭМ |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|
| 121        |     |     |     |     |     |            |     |     |     |      |     | +   |     |      |     |     |     |     |
| 122        |     | ++  |     | +   |     | +++        | ++  |     |     | +    | +++ | +++ | +   |      |     | +   | ++  |     |
| 123        |     |     |     | ++  |     | +          | +++ |     |     | +    | +   | +   | +++ |      |     |     | +++ |     |
| 127        |     | +   |     | +   | +   |            | +   |     |     | +    | +   | +   |     |      |     |     | +   | +   |
| 128        |     | +++ |     |     |     |            | +   |     |     | +    | +   |     | +   |      |     | +   |     |     |
| 129        |     |     | +   |     | +   |            |     |     | ++  |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 130        |     |     | ++  |     |     | +          |     |     | +   |      | +   | +   |     |      |     |     | +   |     |
| 133        | ++  |     |     |     |     |            | +   |     |     |      |     |     | +   | +++  |     |     | +   |     |
| 134        |     |     |     |     |     |            | +   |     |     |      | +   | +   |     |      |     |     |     |     |
| 135        |     |     |     |     |     |            |     |     |     |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 136        |     | +   |     |     |     |            | +   |     |     |      | +   |     |     |      |     | +   |     |     |
| 137        |     |     |     | +   | +   | +          |     |     | +   | +    | +   | +   |     |      |     | +   |     | +   |
| 138        | +   | +   |     | +   | +   | +          |     |     | +   | ++   | ++  | +   | +   |      |     | ++  | +   |     |
| 140        |     |     |     |     |     |            |     |     |     |      | +   | +   |     |      |     | +   |     |     |
| 141        | +   | +   | +   |     |     | +          |     |     |     |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 142        |     |     |     |     | +++ | +          |     |     |     | +    |     |     | +   |      |     |     |     |     |
| 144        |     | +   |     | +   |     |            | +   |     |     |      |     |     | +   |      |     |     |     | +   |
| 145        | +   |     |     |     |     | +          | +   |     |     |      | +   |     | +   | +    |     |     |     | +++ |
| 146        |     |     |     |     |     |            |     | +   |     |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 147        |     |     |     |     |     |            |     |     |     |      |     |     |     |      |     | +   |     |     |
| 148        |     |     |     |     | ++  |            |     |     |     |      |     |     |     |      |     | +   |     |     |
| 149        |     | +++ |     | +   |     | +++        | +++ |     | +++ | +++  |     | +++ | +++ |      |     | +   | +   | ++  |
| 150        | +   | +   | ++  |     | +   |            |     |     | +   | +    | +   | +   |     |      |     | +   |     |     |
| 151        |     | +   |     | +   |     | +          | +   |     |     |      | +   | +   | +   | +    | +   |     | +   | +   |
| 152        | +   |     | +   |     |     |            |     |     | +   |      | +   | +   |     |      |     | +   |     |     |
| 153        |     | +   |     | +   |     |            |     |     |     |      | +   | +   |     |      |     | +   | +   |     |
| 154        |     |     |     |     |     |            |     | ++  |     |      |     |     | +++ |      |     |     |     |     |

| SEQ ID No. | ОМЛ | РМЖ | ХЛЛ | КРК | ГБ  | РЖП_Х<br>К | РЖ | ГКК | НХЛ | НМРЛ | РЯ  | РП  | РГЖ | РПРЖ | ГКК | МРЛ | РМП | РЭМ |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|------------|----|-----|-----|------|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|
| 155        | +   | +   |     | +   | +   | +          |    |     | +   | +    | +   | +   |     |      |     | +   |     |     |
| 156        |     | +   |     | +   |     |            | +  |     |     | +    | +   | +   | +   |      | +   |     |     | +   |
| 157        |     | ++  |     | +   |     | +++        | ++ |     |     | +    | +++ | +++ | +   |      |     | +   | ++  |     |
| 229        |     | +   | ++  |     | ++  | +          |    |     | ++  | ++   | +++ | +++ |     |      | +   | +++ | +   | +   |
| 230        | +   | +   |     | +   | +   | +          | +  |     | +++ | ++   | ++  | ++  | +   |      | +   | +++ | +   | ++  |
| 231        | +   |     | +   |     |     |            |    |     |     |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 232        | +   |     |     | +   |     | +          |    |     | ++  | +    | +   | +   |     |      |     | +   | +   | +   |
| 233        |     |     |     | +   | +   | +          | +  |     | +++ | +    | +   | ++  |     |      |     | +++ |     | +   |
| 234        |     | ++  |     |     |     |            |    |     |     |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 235        | +   | +   |     |     |     |            |    |     | +   | +    | ++  | +   |     |      |     | ++  | +   |     |
| 236        |     |     |     |     |     |            |    |     | +   | +    | +   |     |     | +++  |     | +   |     |     |
| 237        |     | +   |     |     | +   | +          | +  |     | +   |      | +   | +   | +   |      |     |     | +   | +   |
| 238        | +   |     |     |     |     |            |    |     |     |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 239        | +   | +   |     | +   | +   |            |    |     | +   | +    | +   | +   |     |      |     | ++  | +   |     |
| 240        |     |     |     |     |     |            |    |     | +   |      |     | +   |     |      |     |     |     |     |
| 241        |     | +   |     |     |     |            |    |     | +   | +    | +   | +   |     |      |     | +   |     | +   |
| 242        |     |     |     |     | ++  |            |    |     | ++  | ++   | +++ |     |     |      |     |     |     | +++ |
| 243        |     |     | ++  |     |     |            |    |     | +++ | +    | ++  |     |     |      | +   | +   |     |     |
| 244        |     |     |     | +   | +   |            | +  |     |     | +    | ++  | ++  | +   |      |     | +   | +   | +   |
| 245        |     |     |     |     |     |            |    | +   |     |      |     | +   |     |      |     |     |     |     |
| 246        |     | +   |     |     |     |            |    |     |     |      |     |     |     |      |     |     |     | +   |
| 247        | +   | +   |     |     |     |            | +  |     | +   | +    | +   | ++  |     |      |     | +   | +   | +   |
| 248        |     |     |     | +   | ++  |            |    |     | +   |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 249        | +   | +   |     | +   | +   | +          | +  |     | +   | ++   | +   | +   | +   |      |     | ++  | +   | +   |
| 250        |     |     |     |     |     |            |    |     | ++  |      | +   |     |     |      |     |     |     | +   |
| 251        | +++ |     |     |     |     |            |    |     | +   |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 252        | +   | ++  |     | ++  | +++ | ++         | +  |     | +++ | +++  | +++ | +++ | +   |      |     | +++ | ++  | +++ |

| SEQ ID No. | ОМЛ | РМЖ | ХЛЛ | КРК | ГБ  | РЖП_Х<br>К | РЖ | ГКК | НХЛ | НМРЛ | РЯ | РП  | РПЖ | РПрЖ | ПКК | МРЛ | РМП | РЭМ |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|------------|----|-----|-----|------|----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|
| 253        | +   |     | +++ |     |     | +          |    |     |     | +    |    |     |     |      |     | ++  |     |     |
| 254        | +   |     |     |     | +   |            | +  |     | ++  | +    | +  |     |     |      |     | +   |     | +   |
| 255        | +   | +   |     | +   | ++  | +          | ++ |     | +++ | ++   | +  | ++  |     |      |     | ++  |     | ++  |
| 256        |     |     |     | +   | +   | +          | +  |     | ++  | +    |    | +   |     |      |     | ++  |     | +   |
| 257        |     |     |     |     |     |            |    |     |     |      |    |     | +   |      |     |     | +   |     |
| 259        |     |     |     |     |     |            |    |     |     |      | +  |     |     |      |     |     |     |     |
| 263        | ++  |     | +   |     |     |            |    |     | +   |      |    |     |     |      |     |     |     |     |
| 264        |     |     |     |     |     |            |    |     |     |      |    |     |     |      |     | +   |     |     |
| 265        |     |     |     |     |     |            |    |     | +   |      |    |     |     |      |     | +   |     |     |
| 266        | +   |     | +   |     |     |            |    |     |     |      |    |     |     |      |     |     |     |     |
| 290        | +   | +   |     | +   | +   |            | +  |     | +++ | +    | ++ | ++  |     |      |     | +++ | +   | +   |
| 291        | +   | ++  |     | ++  | ++  | +          | +  |     | +++ | +++  | ++ | +++ | +   |      |     | +++ | +   | +   |
| 292        |     |     |     |     |     |            |    |     |     |      | +  |     |     |      |     |     |     |     |
| 293        |     |     |     |     | +++ |            |    |     |     |      |    |     |     |      |     |     |     |     |
| 294        |     |     |     |     | +++ |            |    | ++  |     |      |    |     | +   | +++  |     | +++ |     | +   |
| 158        |     | +   |     | +   | +   |            |    |     | +   | +    | +  | +   |     |      |     | +   |     |     |
| 159        | +   | +   |     | +   | +   | +          |    | +   |     | ++   | +  | +   | +   |      | +   | +   |     |     |
| 160        |     | +   |     | +   |     | +          |    |     | +   | +    | ++ | +   |     |      |     | +++ |     |     |
| 161        | +   |     | +   |     |     |            |    |     |     | +    |    |     |     |      |     |     |     |     |
| 163        | +   |     | +   |     |     |            |    |     |     |      |    |     |     |      |     |     |     |     |
| 164        |     | +   |     |     |     | +          |    |     | +   | +    |    |     | +   |      | ++  | +   |     |     |
| 165        |     | +   |     |     | +   |            |    |     | ++  | +    | +  | +   |     |      |     | ++  | +   |     |
| 166        |     |     |     |     | +   |            |    |     | +   | +    | +  | +   |     |      |     | +   |     |     |
| 167        |     |     |     |     |     |            | +  |     | ++  |      | +  |     |     |      |     |     | +   |     |
| 168        |     |     |     |     |     |            |    |     |     |      | +  |     |     | +    |     | +   |     | +   |
| 169        |     |     |     | +   |     |            | +  |     | +   | +    | +  | ++  | +   |      |     |     | +   |     |
| 170        |     |     |     |     | +   |            |    |     |     | +    | +  | +   |     |      |     |     | +   |     |

| SEQ ID No. | ОМЛ | РМЖ | ХЛЛ | КРК | ГБ  | РЖП_Х<br>К | РЖ  | ГКК | НХЛ | НМРЛ | РЯ  | РП | РГЖ | РПрЖ | ПКК | МРЛ | РМП | РЭМ |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|-----|------|-----|----|-----|------|-----|-----|-----|-----|
| 172        |     |     |     |     | +++ |            |     | +   |     |      | +   |    |     |      | +++ | ++  |     |     |
| 173        | +   |     | +   |     | +   |            |     |     | +   |      |     |    |     |      |     |     |     |     |
| 174        |     |     |     | ++  |     | +          |     |     |     |      |     |    |     |      |     |     | +   |     |
| 175        |     |     |     |     | +   |            |     |     | +   | +    | +   | ++ |     |      |     | ++  | +   |     |
| 176        |     |     |     |     |     |            |     |     |     |      | +   |    |     |      |     |     |     | +   |
| 177        |     |     |     | +++ |     | +++        | +++ |     |     |      | +++ | ++ | +   | +    |     |     | +   |     |
| 178        |     |     |     |     |     |            |     |     | +++ |      |     |    |     |      |     | +++ |     |     |
| 179        |     |     | ++  |     |     |            |     |     |     | +    |     |    |     |      |     |     |     |     |
| 180        |     |     |     | +   | +   | +          | +   | +   |     | +    |     |    | +   |      |     | +   |     | +   |
| 182        |     |     |     |     |     |            |     |     |     |      | +   | +  |     | +++  |     | +   |     | +   |
| 183        | ++  |     |     |     |     |            |     |     | +   |      |     |    |     |      |     |     |     |     |
| 184        |     |     |     |     | +   |            |     |     |     |      |     |    |     |      |     | +   |     |     |
| 185        |     |     |     |     |     |            |     |     |     |      |     | +  |     |      |     |     |     |     |
| 186        |     |     |     |     |     |            |     |     |     | +    |     |    |     |      | +   |     |     |     |
| 187        |     |     |     |     |     |            |     |     | +   | +    | +++ | +  |     |      |     | ++  | +   | +   |
| 188        |     |     |     |     | +++ |            |     |     |     |      |     |    |     |      |     |     |     |     |
| 189        |     |     |     |     | +   |            |     | ++  |     |      |     |    |     | +++  |     | +++ |     |     |
| 190        |     |     | +   |     |     |            |     |     |     |      |     |    |     |      |     |     |     |     |
| 191        |     |     |     |     | +++ |            |     |     |     |      |     |    |     |      |     |     |     |     |
| 192        | +   |     |     |     | +   |            |     |     | ++  | +    | +   | +  |     |      |     | +++ | +   |     |
| 193        |     | +   |     | +   |     | +          |     |     | +   | +    | +   | +  |     |      |     | +   |     |     |
| 194        |     |     |     |     | +   |            |     |     |     |      |     |    |     |      |     |     |     |     |
| 195        |     |     |     |     | +   |            |     |     | +   | +    | +   |    |     |      |     | +   |     | +   |
| 196        |     |     |     |     |     |            |     |     |     |      | +   |    |     |      |     |     |     |     |
| 197        |     |     |     |     |     |            |     |     | +   |      | +   |    |     |      |     | +   |     |     |
| 198        | +   | +   |     | +   | +   | +          |     |     | ++  |      |     |    |     |      |     | +   |     | +   |
| 199        |     |     |     |     |     |            |     |     |     |      |     |    |     | +    |     |     |     |     |

| SEQ ID No. | ОМЛ | РМЖ | ХЛЛ | КРК | ГБ | РЖП_Х<br>К | РЖ  | ГКК | НХЛ | НМРЛ | РЯ  | РП  | РГЖ | РПрЖ | ПКК | МРЛ | РМП | РЭМ |
|------------|-----|-----|-----|-----|----|------------|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|
| 200        |     | +   |     |     | +  |            |     |     |     | +    | +   | +   |     |      |     | +   |     |     |
| 201        |     | +   |     | +   | +  | +          | +   |     | ++  | +    | ++  | ++  | +   |      |     | ++  | +   | +   |
| 202        | +   |     |     |     |    |            |     |     |     |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 203        |     |     |     | +   | +  | +          | +   |     | +   | +    | +   | +   |     |      |     | +   | +   | +   |
| 204        |     | +   |     | +   |    |            |     | +   | ++  |      |     |     |     |      |     |     |     | +   |
| 205        | +   |     | +++ |     |    |            |     |     | ++  |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 206        |     | +   |     |     |    |            |     |     |     |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 207        |     |     |     |     | +  |            |     |     |     | +    |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 208        |     |     |     |     |    |            |     | +++ |     |      |     |     | +++ |      |     | +++ |     |     |
| 210        | +   | +   |     |     | ++ | +++        |     |     | +   | +    |     | +   |     |      | +   |     | +   | +   |
| 211        |     | +   |     | +   |    |            |     |     |     |      |     |     | +   |      |     |     |     | +   |
| 213        |     | +   |     |     |    |            |     |     | ++  |      | +   | +   |     |      |     |     |     | +   |
| 214        | +   | ++  |     |     |    |            |     |     |     | +    | +++ | ++  | +   |      |     | +++ | +   | +   |
| 215        |     |     |     |     | +  |            |     |     |     |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 216        |     |     |     |     | +  |            |     |     |     |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 217        |     | +   |     | ++  | +  | +          | ++  |     |     |      | +   | +   | ++  | +++  | +   | +   |     | +   |
| 218        |     |     |     |     | ++ | +          |     |     |     | +    |     |     |     |      | +   |     |     |     |
| 219        |     |     |     |     | ++ |            |     |     |     | ++   |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 220        |     |     |     | +++ |    | +++        | +++ |     |     | +++  | +++ | +++ | +++ |      |     |     | +++ | +++ |
| 221        |     |     |     |     |    |            |     |     |     |      |     |     |     |      |     |     | +   | +   |
| 222        |     |     |     |     |    |            |     |     |     |      |     |     |     | +    |     |     |     |     |
| 223        |     | +   |     |     |    |            |     |     | +   | +    | ++  | +   | +   |      |     | +   |     |     |
| 224        |     |     | +   |     |    |            |     |     |     |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 225        |     |     |     |     |    |            |     |     |     |      |     |     |     |      |     | +++ |     |     |
| 226        |     |     |     |     |    |            |     |     |     |      |     |     |     |      |     | +   |     |     |
| 267        |     | ++  |     |     |    |            |     |     |     |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 268        | +   |     |     |     | +  |            |     |     | ++  |      | ++  | +   |     |      |     | ++  | +   |     |

| SEQ ID No. | ОМЛ | РМЖ | ХЛЛ | КРК | ГБ  | РЖП_Х<br>К | РЖ  | ГКК | НХЛ | НМРЛ | РЯ  | РП  | РГЖ | РПрЖ | ПКК | МРЛ | РМП | РЭМ |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|
| 270        |     |     |     |     | +   |            |     |     | +   | +    | +   | ++  |     |      |     | ++  | +   |     |
| 271        |     | ++  |     | +++ |     | +++        | +   | +   | ++  | ++   | +++ | +++ | ++  |      | +   | +   | ++  | +++ |
| 272        |     |     |     |     |     |            |     |     | +   | +    | ++  | +   |     |      |     | +   |     |     |
| 274        | +   |     |     |     | +   |            |     |     | +   |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 275        |     |     | +   |     |     |            |     |     |     |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 276        | +   |     |     |     | +   |            |     |     | ++  |      | +   | +   |     |      |     | ++  | +   |     |
| 277        |     | ++  |     | +   |     | ++         | +   |     |     | +++  | ++  | +++ | +   | +    |     | ++  | ++  | +++ |
| 278        |     |     | +++ | +   |     |            | +   |     |     |      |     |     |     |      |     |     |     | +   |
| 279        |     |     |     |     |     |            |     |     |     | +    |     | +   |     |      | +++ |     | +   |     |
| 281        |     | +   |     | +   | +   | +          |     |     | +   | +    | +   | +   |     |      |     | +   |     |     |
| 282        |     |     |     |     |     |            |     |     | +   |      |     |     |     |      |     | +   |     |     |
| 283        |     |     |     |     | +   |            |     | +   |     |      | +   |     |     |      |     |     |     |     |
| 284        |     |     |     |     | +   |            |     |     | +   | +    | +   |     |     | +++  |     | +   |     |     |
| 285        | +   | +   |     |     |     |            |     |     | +   | +    | ++  | +   |     |      |     | ++  | +   |     |
| 287        |     |     |     |     | +   |            |     |     |     |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 288        | ++  |     | +   |     |     |            |     |     | ++  | +    | +   | +   |     |      |     | +   |     |     |
| 295        |     |     |     |     | +++ |            |     |     |     |      |     |     |     |      |     |     |     |     |
| 296        |     |     |     |     | +++ | +          |     |     |     | +    |     |     | +   |      |     |     |     |     |
| 297        |     |     |     |     |     | ++         |     |     |     | +++  | +   | +++ | +   |      |     |     | +++ |     |
| 298        |     | ++  |     | +   |     | +++        | ++  |     |     | +    | +++ | +++ | +   |      |     | +   | ++  |     |
| 299        |     | +   |     | ++  |     | +++        | +++ |     |     | +++  | +++ | +++ | +++ |      |     |     | +++ | +++ |
| 302        |     | +   |     |     |     |            |     |     | +   | +++  | +++ | ++  | +   |      | +   | ++  | +   | ++  |

### 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> Т-клетки-предшественники (Таблица 19).

#### Прайминг CD8<sup>+</sup> Т-клеток *in vitro*

В целях проведения стимуляций *in vitro* искусственными антигенпрезентирующими клетками, нагруженными комплексом пептид-МНС (рМНС) и антителом к CD28, заявители сначала выделили CD8<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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 рМНС 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).

pMHC, использованные для положительных и отрицательных контрольных стимуляций, были A\*0201/MLA-001 (пептид ELAGIGILTV (SEQ ID NO. 303) из модифицированного Melan-A/MART-1) и A\*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI из DDX5, SEQ ID NO. 304), соответственно.

800 000 микросфер / 200 мкл вносили в лунки 96-луночного планшета в присутствии 4 x 12,5 нг другого биотинилированного комплекса pMHC, промывали и затем добавляли 600 нг биотинилированных антител к CD28 в объеме 200 мкл. Стимуляцию проводили в 96-луночных планшетах путем совместной инкубации  $1 \times 10^6$  CD8+ Т-клеток с  $2 \times 10^5$  промытых покрытых микросфер в 200 мкл среды TCM с добавлением 5 нг/мл ИЛ-12 (PromoCell) в течение 3 дней при 37°C. Половина среды была затем заменена на свежую среду TCM с добавлением 80 Ед/мл ИЛ-2, и инкубация была продолжена в течение 4 дней при 37°C. Данный цикл стимуляций производили в общей сложности три раза. Для считывания с pMHC-мультимеров использовали 8 различных молекул pMHC на цикл. Использовался двумерный комбинаторный подход к кодировке, как было описано ранее (Andersen et al., 2012) с незначительными изменениями, относящимися к мечению с 5 различными флуорохромами. Наконец, проводили анализ мультимеров посредством окрашивания клеток набором для определения жизнеспособности клеток при воздействии ближнего ИК-излучения с красителем Live/dead (Invitrogen, Карлсруэ, Германия), клоном SK1 антител CD8-FITC (BD, Гейдельберг, Германия) и мультимерами pMHC с флуоресцентными метками. Для анализа использовали цитометр BD LSR II 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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 различных видов рака

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. Результаты для 10 пептидов по изобретению обобщаются в Таблице 19А. Типичные результаты проточного цитометрического анализа после TUMAP-специфического окрашивания мультимерами для семи пептидов по изобретению показаны на Фигурах 4 и 5 вместе с соответствующими отрицательными контролями. Результаты для 60 пептидов по изобретению обобщаются в Таблице 19Б.

Таблица 19: Иммуногенность пептидов по изобретению HLA I класса *in vitro*

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

| SEQ ID No. | Последовательность | Лунки |
|------------|--------------------|-------|
| 290        | KIVDFSYSV          | ++    |
| 291        | KLDETGNL           | +     |
| 292        | GMMTAILGV          | +     |
| 293        | FLVDGSWSI          | +     |
| 295        | YYPGVILGF          | ++    |
| 296        | TYVDSSHTI          | +     |

|     |           |    |
|-----|-----------|----|
| 297 | PFLQASPHF | ++ |
| 298 | RYLEGTSCI | +  |
| 300 | AYVLRLETL | +  |
| 301 | AYKPGALTF | +  |

Таблица 19Б: Иммуногенность пептидов по изобретению HLA I класса *in vitro*

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

| SEQ ID No | Последовательность | Положительные лунки [%] |
|-----------|--------------------|-------------------------|
| 1         | LLYPEPWSV          | ++                      |
| 2         | GLIAGVVS           | ++                      |
| 4         | KLMPGTYTL          | +                       |
| 5         | GIVAHIQEV          | +                       |
| 6         | ALFDSL RHV         | ++                      |
| 7         | ILDHEVPSL          | ++                      |
| 11        | ALSPSYLTV          | ++                      |
| 12        | GLLPLLHRA          | ++++                    |
| 14        | ILAKDLFEI          | ++                      |
| 18        | ILLDLTDNRL         | +                       |
| 20        | GLSQITNQL          | ++                      |
| 23        | SLFSDEFKV          | ++++                    |
| 26        | ALQEELTEL          | +                       |
| 27        | RLMEENWNA          | +++                     |
| 29        | YLLDPSITL          | +                       |
| 31        | TITETTVEV          | +                       |
| 35        | FLLPFSTVYL         | +                       |
| 90        | FLQDLEQRL          | +                       |
| 92        | GLLFSLRSV          | ++                      |
| 96        | LLVSHLYLV          | ++                      |
| 138       | ALLAKILQI          | ++                      |
| 141       | FLDKVLVAA          | +                       |
| 144       | ALLAFFPGL          | +++                     |
| 149       | ILNTHITEL          | +                       |
| 150       | VLYDRPLKI          | ++                      |
| 151       | SVLDSTAKV          | ++                      |
| 229       | AILAHLNTV          | ++                      |
| 230       | KLQNIMMLL          | ++++                    |
| 232       | KIFPAALQLV         | ++                      |
| 233       | HLFDAFVSV          | ++                      |
| 235       | KIIDFLSAL          | +++                     |
| 247       | ALYEGYATV          | ++                      |
| 248       | YLDRFLAGV          | ++                      |

| SEQ ID No | Последовательность | Положительные лунки [%] |
|-----------|--------------------|-------------------------|
| 249       | GLCERLVSL          | +                       |
| 251       | ALSVLRAL           | ++                      |
| 158       | HYSQELSLLYL        | +                       |
| 159       | LYNKGFIYL          | ++++                    |
| 160       | VYTLDIPVL          | ++                      |
| 161       | IYLVSIPEL          | ++                      |
| 162       | VFTRVSSFL          | ++                      |
| 163       | DYLKGLASF          | +                       |
| 165       | DYTTWTALL          | +                       |
| 166       | YYVESGKLF          | +++                     |
| 167       | NYINRILKL          | +                       |
| 168       | KYQDILETI          | ++                      |
| 169       | AYTLIAPNI          | +++                     |
| 173       | IYSWILDHF          | ++                      |
| 176       | EYNQWFTKL          | +++                     |
| 196       | LYIDRPLPYL         | ++++                    |
| 197       | EYSLFPGQVVI        | +                       |
| 199       | RYAEVVGIF          | ++                      |
| 200       | YYGPSLFLL          | ++                      |
| 204       | TYELRYFQI          | +                       |
| 207       | AYVVFVSTL          | +                       |
| 218       | YYKSTSSAF          | +                       |
| 222       | TFSVSSHLLF         | ++                      |
| 268       | QYLGQIQHI          | +                       |
| 269       | YFIDSTNLKTHF       | +                       |
| 281       | PYRLIFEKF          | +++                     |
| 285       | HYPPVQVLF          | +                       |

#### 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 20: Показатели связывания с молекулами МНС I класса. Связывание рестриктированных по молекулам HLA I класса пептидов с HLA-A\*02

распределено по выходу пептидного обмена: <20 % = +; 20 % - 49 % = ++; 50 % - 75 % = +++; >= 75 % = ++++

| SEQ ID No | Последовательность | Пептидный обмен |
|-----------|--------------------|-----------------|
| 1         | LLYPEPWSV          | ++++            |
| 2         | GLIAGVVS           | +++             |
| 3         | KLEENGDLYL         | ++++            |
| 4         | KLMPGTYTL          | ++++            |
| 5         | GIVAHIQEV          | +++             |
| 6         | ALFDSL RHV         | +++             |
| 7         | ILDHEVPSL          | +++             |
| 9         | FLVDGSYSI          | +++             |
| 10        | GIAGSLKTV          | +++             |
| 11        | ALSPSYLTV          | +++             |
| 12        | GLLPLLHRA          | ++++            |
| 13        | ALMAMLVYV          | ++              |
| 14        | ILAKDLFEI          | ++++            |
| 15        | YLDLSHNQL          | +++             |
| 16        | YTLDIPVLFV         | ++++            |
| 18        | ILLDLTDNRL         | +++             |
| 19        | SISDNVWEV          | +++             |
| 20        | GLSQITNQL          | +++             |
| 21        | AIQDEIRSV          | +++             |
| 22        | FVDPNTQEKV         | ++              |
| 23        | SLFSDEFKV          | +++             |
| 24        | TLDEKVAEL          | +++             |
| 25        | TMDSVLVTV          | +++             |
| 26        | ALQEELTEL          | +++             |
| 27        | RLMEENWNA          | +++             |
| 28        | SLPNGKPVSV         | +++             |
| 29        | YLLDPSITL          | +++             |
| 30        | AMIEEVFEA          | ++              |
| 31        | TITETTVEV          | +++             |
| 32        | VQLDSIEDLEV        | +++             |
| 33        | YIKTELISV          | +++             |
| 34        | FLLATEVVTV         | ++++            |
| 35        | FLLPFSTVYL         | +++             |
| 36        | SLADTNSLAVV        | +++             |
| 37        | ILAPFSVDL          | +++             |
| 38        | FLGPRIIGL          | +++             |
| 39        | HLLEGSGVGV         | +++             |
| 40        | VLIDPQWVLTA        | +++             |
| 41        | ALFENTPKA          | ++              |
| 42        | LLDSVSRL           | +               |
| 43        | KAIEVLLTL          | +++             |
| 44        | SLFETAWEA          | +++             |
| 45        | SLTEVSLPL          | +++             |
| 46        | SQFPLPLAV          | ++              |

| SEQ ID No | Последовательность | Пептидный обмен |
|-----------|--------------------|-----------------|
| 47        | ALLERGELFV         | +++             |
| 48        | QVIEDSTGV          | ++              |
| 49        | ALNIATHVL          | +++             |
| 50        | ILFHGVFYA          | +++             |
| 51        | LLFSRLCGA          | ++++            |
| 53        | KMVGLVVAI          | +++             |
| 54        | VLNPLITAV          | +++             |
| 55        | SLATKIVEA          | +++             |
| 56        | FLHDEKEGIYI        | +++             |
| 57        | TVFTDHMLTV         | ++              |
| 58        | YLLPLL PAL         | +++             |
| 59        | KLLDPQEFTL         | +++             |
| 60        | ALFAPLVHL          | +++             |
| 61        | AIVKEIVNI          | ++              |
| 62        | ALNPELVQA          | ++              |
| 63        | SQIPAQPSV          | ++              |
| 64        | SLFPDSLIV          | ++              |
| 65        | SVVPDVR SV         | ++              |
| 66        | KLIFSVEAV          | +++             |
| 67        | TLLQRLTEV          | +++             |
| 68        | SLSNRLYYL          | +++             |
| 69        | FLAVGLVDV          | +++             |
| 70        | LLLGDSALYL         | +++             |
| 71        | VLH SKFVV          | +++             |
| 72        | FLTAINYLL          | +++             |
| 73        | YTLREVDTV          | ++              |
| 74        | TLFGYSVVL          | +++             |
| 75        | AVIKFLELL          | +++             |
| 76        | AVGPVHNSV          | ++              |
| 77        | TLIDEQDIPLV        | +++             |
| 78        | TVVTRLDEI          | ++              |
| 79        | VTFKEYVTV          | ++              |
| 80        | KLYEADFVL          | ++              |
| 81        | NALDKVLSV          | +++             |
| 82        | FIFDEAEKL          | +               |
| 83        | GQASYFYVA          | ++              |
| 84        | ALCPRIHEV          | ++++            |
| 85        | VLNDILVRA          | +++             |
| 86        | SVDSHFQEV          | ++              |
| 87        | TIYKDFVYI          | ++              |
| 88        | AQADHLPQL          | ++              |
| 89        | QLAPVFQRV          | ++              |
| 90        | FLQDLEQRL          | +++             |
| 92        | GLLFSLR SV         | ++++            |
| 94        | LLPAVPVGA          | +++             |
| 95        | GLLGSLFFL          | ++++            |

| SEQ ID No | Последовательность | Пептидный обмен |
|-----------|--------------------|-----------------|
| 96        | LLVSHLYLV          | ++              |
| 98        | RLFPDFFTRVAL       | ++              |
| 99        | YLLQSVNQLLL        | ++              |
| 100       | ALLGMIIVGV         | +               |
| 101       | ALADFMLS           | +++             |
| 102       | VLLDIQEVFQI        | +++             |
| 103       | YLVSEIFKA          | +++             |
| 104       | ALISWQPPRA         | +++             |
| 105       | ALLGTKILL          | +++             |
| 106       | FINDSIVYL          | +++             |
| 107       | LLVPTSGIYFV        | +++             |
| 108       | ILLKNLVTI          | ++              |
| 109       | SLDPSVTHL          | ++              |
| 110       | FLLGVSKEV          | +++             |
| 111       | AIVDLIHD           | ++              |
| 112       | SLGKFTFDV          | ++++            |
| 113       | FLERGLESA          | ++              |
| 114       | QLIQTLHAV          | +++             |
| 115       | SLDPDTLPAV         | ++              |
| 117       | KMPDVELFV          | +++             |
| 118       | QLWQFLVTL          | +++             |
| 119       | FIIQGLRSVGA        | +++             |
| 120       | VTPVTVSAV          | +               |
| 121       | FTIFRTISV          | +++             |
| 122       | GVVDPVHGV          | ++              |
| 123       | VLDPALPALV         | ++              |
| 124       | KVMATIEKV          | ++              |
| 125       | SLADYEHFV          | ++++            |
| 126       | QMFQYFITV          | ++++            |
| 127       | KLDGNELDL          | +++             |
| 128       | TQSPATLSV          | ++              |
| 129       | RLQDILWFL          | ++++            |
| 130       | SLLGGTFVGI         | +++             |
| 131       | VTSNSGILGV         | +++             |
| 132       | ILGEVLAQL          | +++             |
| 133       | ALLPRLHQL          | ++++            |
| 134       | GLAVPTPSV          | +++             |
| 135       | HLSTIIHEA          | +++             |
| 136       | FLFGGVLMTL         | ++              |
| 138       | ALLAKILQI          | +++             |
| 139       | FLLPTGAEA          | ++              |
| 141       | FLDKVLVAA          | +++             |
| 142       | ILVEGISTV          | +++             |
| 143       | ALLPELREV          | +++             |
| 144       | ALLAFFPGL          | +++             |
| 145       | YLWATIQRI          | +++             |

| SEQ ID No | Последовательность | Пептидный обмен |
|-----------|--------------------|-----------------|
| 146       | ALHFSEDEI          | ++              |
| 147       | YLMDDTVEI          | ++++            |
| 148       | MLAGIAITV          | +++             |
| 149       | ILNTHITEL          | +++             |
| 150       | VLYDRPLKI          | +++             |
| 151       | SVLDSTAKV          | ++              |
| 152       | MMVGDLLEV          | +++             |
| 153       | FISERVEVV          | ++++            |
| 154       | RLLGTEFQV          | +++             |
| 155       | LLNPVVEFV          | +++             |
| 156       | ILGDLSHLL          | +++             |
| 157       | TLTSLLAQA          | +++             |
| 229       | AILAHLNTV          | ++++            |
| 230       | KLQNIMMLL          | ++              |
| 231       | MLDKYSHYL          | +++             |
| 232       | KIFPAALQLV         | +++             |
| 233       | HLFDAFVSV          | +++             |
| 234       | LLSPHNPAL          | +++             |
| 235       | KIIDFLSAL          | +++             |
| 236       | STIAILNSV          | +++             |
| 237       | ALAPHLDDA          | +++             |
| 238       | GLYERPTAA          | ++              |
| 239       | KMNESTRSV          | ++              |
| 240       | YMGECKLIASV        | +++             |
| 241       | KTIQQLETV          | ++              |
| 242       | WLYGEDHQL          | ++              |
| 243       | FMADDIFSV          | +++             |
| 244       | YLLEKNRVV          | ++              |
| 245       | SLLDLPLSL          | ++++            |
| 246       | TVSDVLNSV          | +++             |
| 247       | ALYEGYATV          | +++             |
| 248       | YLDRFLAGV          | ++++            |
| 249       | GLCERLVSL          | ++++            |
| 250       | SLAPATPEV          | +++             |
| 251       | ALSVLRLAL          | +++             |
| 252       | RLMEICESL          | +++             |
| 253       | ALAEIDNSL          | +++             |
| 254       | KLQGKLPKL          | ++              |
| 255       | SLLHFTENL          | +++             |
| 256       | SLGEEQFSV          | ++              |
| 257       | GLYTDPCGV          | ++++            |
| 258       | LLSERFINV          | ++++            |
| 259       | ILLPRIIEA          | +++             |
| 260       | ILLEKILSL          | +++             |
| 261       | QLQDRVYAL          | +++             |
| 262       | FMVDKAIYL          | +++             |

| SEQ ID No | Последовательность | Пептидный обмен |
|-----------|--------------------|-----------------|
| 263       | VLLSEQGDVKL        | ++              |
| 264       | KLFPQETLFL         | +++             |
| 265       | NTCPYVHNI          | +++             |
| 266       | YAIGLVMRL          | +++             |

Таблица 21: Показатели связывания с молекулами МНС I класса. Связывание рестриктированных по молекулам HLA I класса пептидов с HLA-A\*24 распределено по выходу пептидного обмена: <20 % = +; 20 % - 49 % = ++; 50 % - 75 % = +++; >= 75 % = ++++

| SEQ ID No | Последовательность | Пептидный обмен |
|-----------|--------------------|-----------------|
| 172       | TYTTVPRVAF         | ++++            |
| 177       | VYPWLGALL          | ++++            |
| 178       | IFIEVFSHF          | +++             |
| 179       | MYDSYWRQF          | ++++            |
| 180       | IYDDSFIRPVT        | +++             |
| 181       | LYLDIINLF          | ++++            |
| 182       | IYQLDTASI          | +++             |
| 183       | VFTSTARAF          | +++             |
| 184       | VFQNFPLLF          | ++++            |
| 185       | IYKVGAPTI          | +++             |
| 186       | IFPQFLYQF          | ++++            |
| 187       | TYLRDQHFL          | ++++            |
| 188       | RYFKGLVF           | +++             |
| 189       | WYVNGVNYF          | ++              |
| 190       | GFFIFNERF          | +++             |
| 191       | VFKASKITF          | +++             |
| 192       | SYALLTYMI          | ++++            |
| 193       | RFHPTPLLL          | ++++            |
| 194       | EFGSLHLEFL         | +               |
| 198       | LYLDKATLI          | +++             |
| 203       | FYSRLLQKF          | +++             |
| 205       | VHIPEVYLI          | +++             |
| 206       | EYQENFLSF          | +++             |
| 208       | TYTQDFNKF          | +++             |
| 210       | IYTMIIYRNL         | ++++            |
| 211       | YYLEVGTKLI         | ++++            |
| 214       | LYLKLWNLI          | +++             |
| 215       | YFDKVVTI           | ++              |
| 216       | QYSSVFKSL          | ++++            |
| 217       | FFPPTRQMGLLF       | ++++            |
| 219       | EYPLVINTI          | +++             |
| 220       | GYIDNVTI           | ++++            |
| 221       | RYSTGLAGNLI        | +++             |
| 223       | KYIPYKYVI          | +++             |

| SEQ ID No | Последовательность | Пептидный обмен |
|-----------|--------------------|-----------------|
| 224       | QYLENLEKL          | +++             |
| 225       | YYVYIMNHL          | +++             |
| 226       | VYRDETSELF         | +++             |
| 227       | IFLDYEAGTSLF       | ++++            |
| 228       | KYTSWYVAL          | ++++            |
| 267       | KYMVYPQTF          | ++++            |
| 271       | LYHDIFSRL          | ++++            |
| 272       | QYLQDAYSF          | ++++            |
| 273       | TYIKPISKL          | +++             |
| 274       | AYLHSHALI          | ++++            |
| 275       | EYINQGDLEHF        | +++             |
| 276       | VYGFQWRHF          | ++++            |
| 278       | RYISDQLFTNF        | ++++            |
| 279       | TYIESASEL          | +++             |
| 280       | RYPDNLKHL          | ++++            |
| 282       | KFVDSTFYL          | ++++            |
| 283       | TYGDAGLTYTF        | +++             |
| 284       | RYLNKAFHI          | +++             |
| 286       | RYPDNLKHL          | ++              |
| 288       | VYVSDIQEL          | +++             |
| 289       | KYPVEWAKF          | ++++            |
| 158       | HYSQELSLLYL        | ++++            |
| 159       | LYNKGFIYL          | ++++            |
| 160       | VYTLDIPVL          | ++++            |
| 161       | IYLVSIPEL          | ++++            |
| 162       | VFTRVSSFL          | +++             |
| 163       | DYLGKGLASF         | ++++            |
| 164       | KFSSFSLFF          | +++             |
| 165       | DYTTWTALL          | ++++            |
| 166       | YYVESGKLF          | ++++            |
| 167       | NYINRILKL          | ++++            |
| 168       | KYQDILETI          | ++++            |
| 169       | AYTLIAPNI          | +++             |
| 170       | VYEDQVGKF          | ++              |
| 171       | LFIPSSKLLFL        | +++             |
| 173       | IYSWILDHF          | ++++            |
| 174       | VYVGGGQIIHL        | +++             |
| 175       | YYEVHKELF          | ++++            |
| 176       | EYNQWFTKL          | +++             |
| 195       | TYSVSFPMF          | ++++            |
| 196       | LYIDRPLPYL         | +++             |
| 197       | EYSLFPGQVVI        | +++             |
| 199       | RYAEEVGIF          | +++             |
| 200       | YYGPSLFL           | +++             |
| 201       | IYATEAHVF          | +++             |
| 202       | VYWDSAGAAHF        | ++++            |
| 204       | TYELRYFQI          | ++++            |

| SEQ ID No | Последовательность | Пептидный обмен |
|-----------|--------------------|-----------------|
| 207       | AYVVFVSTL          | ++              |
| 209       | TYKDEGNDYF         | +++             |
| 218       | YYKSTSSAF          | +++             |
| 222       | TFSVSSHLLF         | +++             |
| 268       | QYLGQIQHI          | +++             |
| 269       | YFIDSTNLKTHF       | +++             |
| 270       | NYYEVDHKELF        | +++             |
| 277       | VYQGHTALL          | ++++            |
| 281       | PYRLIFEKF          | ++              |
| 285       | HYPPVQVLF          | +++             |
| 287       | LYITEPKTI          | +++             |

#### ПРИМЕР 6:

##### Абсолютное количественное определение опухолеассоциированных пептидов, презентруемых на поверхности клетки

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

##### Количественное определение пептида с помощью наноЖХ-МС/МС

Для точного количественного определения пептидов методом масс-спектрометрии проводили построение калибровочной кривой для каждого пептида при использовании метода внутреннего стандарта. Внутренний стандарт является вариантом каждого пептида с двойными изотопными метками, т. е. во время синтеза TUMAP были введены две аминокислоты с изотопными метками. От опухолеассоциированного пептида он отличается лишь по своей массе, но не имеет различий по другим физико-химическим свойствам (Anderson

et al., 2012). Внутренний стандарт добавляли в известном количестве в каждый МС-образец, и все МС-сигналы были нормализованы относительно МС-сигнала внутреннего стандарта, чтобы сгладить потенциальные технические вариации МС-экспериментов. Калибровочные кривые были построены по меньшей мере в трех разных матрицах, т. е. элюатах пептида HLA из природных образцов, подобных обычным образцам для МС, и каждый препарат прошел два цикла измерений на МС. В целях оценки проводили нормализацию МС-сигналов относительно сигнала внутреннего стандарта и расчет калибровочной кривой методом логистической регрессии. Для количественного определения опухолеассоциированных пептидов из образцов тканей в соответствующие образцы также добавляли известное количество внутреннего стандарта; проводили нормализацию МС-сигналов относительно внутреннего стандарта и проводили количественное определение с помощью калибровочной кривой пептида.

#### Эффективность выделения комплексов пептид/МНС

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

Эффективность выделения анализировали на небольшом числе образцов, и она была сопоставимой среди этих образцов тканей. Напротив, эффективность

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

#### Определение числа клеток в твердой замороженной ткани

В целях определения числа клеток образцов тканей, подлежащих абсолютному количественному определению пептида, авторы изобретения применяли анализ содержания ДНК. Этот метод применим к широкому диапазону образцов различного происхождения и, что наиболее важно, к замороженным образцам (Alcoser et al., 2011; Forsey and Chaudhuri, 2009; Silva et al., 2013). Во время выполнения протокола выделения образец ткани обрабатывают до получения гомогенного лизата, из которого берут небольшую аликвоту лизата. Аликвоту делят на три части, из которых выделяют ДНК (набор QiaAmp DNA Mini Kit, Qiagen, Хильден, Германия). Общее содержание ДНК из каждой процедуры выделения ДНК подвергается количественному определению с помощью количественного анализа ДНК на основе флуоресценции (набор для количественного анализа Qubit dsDNA HS, Life Technologies, Дармштадт, Германия) по меньшей мере на двух повторных циклах.

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

#### Число копий пептида на одну клетку

С помощью данных перечисленных ранее экспериментов авторы изобретения рассчитали число копий пептидов TUMAP на клетку, разделив общее количество

пептида на общее число клеток в образце, а затем поделив на эффективность выделения. Число копий клеток для выбранных пептидов показано в Таблице 22.

Таблица 22: Абсолютное число копий. В таблице указаны результаты абсолютного количественного определения пептидов в опухолевых образцах. Медианное число копий на клетку указано для каждого пептида: <100 = +; >=100 = ++; >=1,000 +++; >=10,000 = +++. Указано число образцов, для которых имеются поддающиеся оценке, высококачественные данные МС.

| SEQ ID No. | Код пептида | Число копий на клетку (медиана) | Количество образцов |
|------------|-------------|---------------------------------|---------------------|
| 2          | MET-007     | +                               | 15                  |
| 24         | MAGEC2-001  | +                               | 16                  |
| 32         | PRAME-006   | ++                              | 17                  |
| 39         | ABCC11-001  | +                               | 14                  |
| 251        | SPINK2-001  | ++                              | 16                  |

#### Список цитируемой литературы

- Abdelmalak, C. A. et al., Clin Lab **60** (2014): 55-61  
Accardi, L. et al., Int.J Cancer **134** (2014): 2742-2747  
Alcoser, S. Y. et al., BMC.Biotechnol. **11** (2011): 124  
Allison, J. P. et al., Science **270** (1995): 932-933  
American Cancer Society, (2015), [www.cancer.org](http://www.cancer.org)  
Ampie, L. et al., Front Oncol. **5** (2015): 12  
Andersen, R. S. et al., Nat.Protoc. **7** (2012): 891-902  
Anderson, N. L. et al., J Proteome.Res **11** (2012): 1868-1878  
Appay, V. et al., Eur.J Immunol. **36** (2006): 1805-1814  
Avigan, D. et al., Clin Cancer Res. **10** (2004): 4699-4708  
Banchereau, J. et al., Cell **106** (2001): 271-274  
Beard, R. E. et al., Clin Cancer Res **19** (2013): 4941-4950  
Beatty, G. et al., J Immunol **166** (2001): 2276-2282  
Beggs, J. D., Nature **275** (1978): 104-109  
Benjamini, Y. et al., Journal of the Royal Statistical Society.Series B (Methodological), **Vol.57** (1995): 289-300  
Berman, R. S. et al., National Cancer Institute: PDQ(R) Colon Cancer Treatment (2015a)  
Berman, R. S. et al., National Cancer Institute: PDQ(R) Rectal Cancer Treatment (2015b)  
Bill, K. L. et al., Lab Invest (2015)  
Borel, F. et al., Hepatology **55** (2012): 821-832  
Boulter, J. M. et al., Protein Eng **16** (2003): 707-711  
Braumuller, H. et al., Nature (2013)  
Bray, F. et al., Int J Cancer **132** (2013): 1133-1145  
Brossart, P. et al., Blood **90** (1997): 1594-1599  
Bruckdorfer, T. et al., Curr.Pharm.Biotechnol. **5** (2004): 29-43

- Bujas, T. et al., Eur.J Histochem. **55** (2011): e7
- Butterfield, L. H. et al., Clin Cancer Res **12** (2006): 2817-2825
- Butterfield, L. H. et al., Clin Cancer Res **9** (2003): 5902-5908
- Carballido, E. et al., Cancer Control **19** (2012): 54-67
- Card, K. F. et al., Cancer Immunol Immunother. **53** (2004): 345-357
- Chang, Y. S. et al., Cancer Chemother.Pharmacol. **59** (2007): 561-574
- Chanock, S. J. et al., Hum.Immunol. **65** (2004): 1211-1223
- Chapiro, J. et al., Radiol.Med. **119** (2014): 476-482
- Chen, T. et al., Proteins **77** (2009): 209-219
- ClinicalTrials.gov, (2015), <http://www.clinicaltrials.gov>
- Cliteur, V. P. et al., Clin Sarcoma.Res **2** (2012): 3
- Cohen, C. J. et al., J Mol Recognit. **16** (2003a): 324-332
- Cohen, C. J. et al., J Immunol **170** (2003b): 4349-4361
- Cohen, S. N. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **69** (1972): 2110-2114
- Coligan, J. E. et al., Current Protocols in Protein Science (1995)
- Colombetti, S. et al., J Immunol. **176** (2006): 2730-2738
- Coosemans, A. et al., Anticancer Res **33** (2013): 5495-5500
- Counter, C. M. et al., Blood **85** (1995): 2315-2320
- Dannenmann, S. R. et al., Cancer Immunol.Res. **1** (2013): 288-295
- Dengjel, J. et al., Clin Cancer Res **12** (2006): 4163-4170
- Denkberg, G. et al., J Immunol **171** (2003): 2197-2207
- Dyrskjot, L. et al., Br.J Cancer **107** (2012): 116-122
- Economopoulou, P. et al., Ann.Transl.Med. **4** (2016): 173
- Edwards, S. et al., Br.J Cancer **92** (2005): 376-381
- Emens, L. A., Expert.Rev.Anticancer Ther. **12** (2012): 1597-1611
- Estey, E. H., Am.J Hematol. **89** (2014): 1063-1081
- Evans, R. L. et al., Cancer Prev.Res (Phila) **7** (2014): 545-555
- Falk, K. et al., Nature **351** (1991): 290-296
- Ferlay et al., GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No.11 [Internet], (2013), <http://globocan.iarc.fr>
- Finocchiaro, G. et al., Ann.Transl.Med. **3** (2015): 83
- Follenzi, A. et al., Nat Genet. **25** (2000): 217-222
- Fong, L. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **98** (2001): 8809-8814
- Forsey, R. W. et al., Biotechnol.Lett. **31** (2009): 819-823
- Fuge, O. et al., Res Rep.Urol. **7** (2015): 65-79
- Gabrilovich, D. I. et al., Nat Med. **2** (1996): 1096-1103
- Gandhi, A. V. et al., Ann Surg.Oncol **20 Suppl 3** (2013): S636-S643
- Gattinoni, L. et al., Nat Rev.Immunol **6** (2006): 383-393
- Giannopoulos, K. et al., Leukemia **24** (2010): 798-805
- Giannopoulos, K. et al., Int.J Oncol **29** (2006): 95-103
- Gnjatic, S. et al., Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A **100** (2003): 8862-8867
- Godkin, A. et al., Int.Immunol **9** (1997): 905-911
- Goede, V. et al., N.Engl.J Med. **370** (2014): 1101-1110
- Gomes, I. M. et al., Mol.Cancer Res **10** (2012): 573-587
- Gonen-Korkmaz, C. et al., Exp.Ther.Med **8** (2014): 1695-1700

- Granziero, L. et al., Blood **97** (2001): 2777-2783
- 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
- Grunewald, T. G. et al., Biol Cell **104** (2012): 641-657
- Gunawardana, C. et al., Br.J Haematol. **142** (2008): 606-609
- Guo, Y. et al., Clin Cancer Res **15** (2009): 1762-1769
- Gustafsson, C. et al., Trends Biotechnol. **22** (2004): 346-353
- Hallek, Michael et al., ASH Annual Meeting Abstracts **112** (2008): 325
- Hao, J. et al., Oncotarget. **6** (2015): 42028-42039
- Harig, S. et al., Blood **98** (2001): 2999-3005
- Hemminger, J. A. et al., Mod.Pathol. **27** (2014): 1238-1245
- Hinrichs, C. S. et al., Nat.Biotechnol. **31** (2013): 999-1008
- Hlavata, I. et al., Mutagenesis **27** (2012): 187-196
- Holtl, L. et al., Clin.Cancer Res. **8** (2002): 3369-3376
- Honorat, M. et al., BMC.Struct.Biol **13** (2013): 7
- Horig, H. et al., Cancer Immunol Immunother. **49** (2000): 504-514
- Hung, C. F. et al., Immunol.Rev **222** (2008): 43-69
- Hus, I. et al., Oncol Rep. **20** (2008): 443-451
- Hwang, M. L. et al., J Immunol. **179** (2007): 5829-5838
- Inoue, H. et al., Int.J Cancer **63** (1995): 523-526
- Jones, R. T. et al., Urol.Clin North Am. **43** (2016): 77-86
- Jung, G. et al., Proc Natl Acad Sci U S A **84** (1987): 4611-4615
- Kalos, M. et al., Sci.Transl.Med. **3** (2011): 95ra73
- Kanthan, R. et al., J Oncol **2015** (2015): 967472
- Kaufman, H. L. et al., Clin Cancer Res **14** (2008): 4843-4849
- Kibbe, A. H., Handbook of Pharmaceutical Excipients **rd** (2000)
- Kimura, H. et al., Int.J Oncol **30** (2007): 171-179
- Knollman, H. et al., Ther.Adv.Urol. **7** (2015): 312-330
- Koido, S. et al., World J Gastroenterol. **19** (2013): 8531-8542
- Kono, K. et al., Cancer Sci. **100** (2009): 1502-1509
- Krackhardt, A. M. et al., Blood **100** (2002): 2123-2131
- Krieg, A. M., Nat Rev.Drug Discov. **5** (2006): 471-484
- Kronenberger, K. et al., J Immunother. **31** (2008): 723-730
- Kuball, J. et al., Blood **109** (2007): 2331-2338
- Lajmi, N. et al., Br.J Haematol. **171** (2015): 752-762
- Lee, W. C. et al., J Immunother. **28** (2005): 496-504
- Liang, Z. et al., Zhonghua Zhong Liu Za Zhi. **27** (2005): 534-537
- Liddy, N. et al., Nat Med. **18** (2012): 980-987
- Liu, H. et al., Oncotarget. (2016)
- Ljunggren, H. G. et al., J Exp.Med. **162** (1985): 1745-1759
- Llovet, J. M. et al., N.Engl.J Med. **359** (2008): 378-390
- Longenecker, B. M. et al., Ann N.Y.Acad.Sci. **690** (1993): 276-291
- Lonsdale, J., Nat.Genet. **45** (2013): 580-585
- Lukas, T. J. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **78** (1981): 2791-2795

- Lundblad, R. L., Chemical Reagents for Protein Modification **3rd** (2004)
- Mantia-Smaldone, G. M. et al., Hum.Vaccin.Immunother. **8** (2012): 1179-1191
- Marten, A. et al., Cancer Immunol.Immunother. **51** (2002): 637-644
- Massari, F. et al., Cancer Treat.Rev. **41** (2015): 114-121
- Matsueda, S. et al., World J Gastroenterol. **20** (2014): 1657-1666
- Maus, M. V. et al., Blood **123** (2014): 2625-2635
- Mayr, C. et al., Exp.Hematol. **34** (2006): 44-53
- Mayr, C. et al., Blood **105** (2005): 1566-1573
- Meziere, C. et al., J Immunol **159** (1997): 3230-3237
- Mitsuhashi, K. et al., Int.J Hematol. **100** (2014): 88-95
- Miyagi, Y. et al., Clin Cancer Res **7** (2001): 3950-3962
- Molina, J. R. et al., Mayo Clin Proc. **83** (2008): 584-594
- Morgan, R. A. et al., Science **314** (2006): 126-129
- Mori, M. et al., Transplantation **64** (1997): 1017-1027
- Mortara, L. et al., Clin Cancer Res. **12** (2006): 3435-3443
- Moulton, H. M. et al., Clin Cancer Res **8** (2002): 2044-2051
- Mueller, L. N. et al., J Proteome.Res **7** (2008): 51-61
- Mueller, L. N. et al., Proteomics. **7** (2007): 3470-3480
- Muller, M. R. et al., Blood **103** (2004): 1763-1769
- Mumberg, D. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **96** (1999): 8633-8638
- National Cancer Institute, (5-6-2015), [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)
- National Cancer Institute (NCI), (19-1-2011), <http://www.cancer.gov/cancertopics/wyntk/kidney/page3>
- O'Prey, J. et al., J Virol. **82** (2008): 5933-5939
- Ohigashi, Y. et al., Clin Cancer Res. **11** (2005): 2947-2953
- Okuno, K. et al., Exp.Ther Med. **2** (2011): 73-79
- Palma, M. et al., Cancer Immunol Immunother. **57** (2008): 1705-1710
- Palmer, D. H. et al., Hepatology **49** (2009): 124-132
- Palomba, M. L., Curr.Oncol Rep. **14** (2012): 433-440
- Parikh, S. A. et al., Blood **118** (2011): 2062-2068
- Petrini, I., Ann.Transl.Med. **3** (2015): 82
- Phan, G. Q. et al., Cancer Control **20** (2013): 289-297
- Pinheiro, J. et al., nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models (<http://CRAN.R-project.org/package=nlme>) (2015)
- Plebanski, M. et al., Eur.J Immunol **25** (1995): 1783-1787
- Porta, C. et al., Virology **202** (1994): 949-955
- Porter, D. L. et al., N.Engl.J Med. **365** (2011): 725-733
- Qin, Y. et al., Chin Med.J (Engl.) **127** (2014): 1666-1671
- Quillien, V. et al., Anticancer Res. **17** (1997): 387-391
- Quinn, D. I. et al., Urol.Oncol. (2015)
- Rakic, M. et al., Hepatobiliary.Surg.Nutr. **3** (2014): 221-226
- Rammensee, H. et al., Immunogenetics **50** (1999): 213-219
- RefSeq, The NCBI handbook [Internet], Chapter 18, (2002), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21091/>
- Reinisch, W. et al., J Immunother. **25** (2002): 489-499

- Reinmuth, N. et al., Dtsch.Med.Wochenschr. **140** (2015): 329-333
- Reynolds, P. A. et al., Genes Dev. **17** (2003): 2094-2107
- Richards, S. et al., J Natl.Cancer Inst. **91** (1999): 861-868
- Rini, B. I. et al., Cancer **107** (2006): 67-74
- Robak, T. et al., Expert.Opin.Biol.Ther **14** (2014): 651-661
- Rock, K. L. et al., Science **249** (1990): 918-921
- Rouanne, M. et al., Crit Rev Oncol Hematol. **98** (2016): 106-115
- S3-Leitlinie Lungenkarzinom, **020/007**, (2011)
- Saiki, R. K. et al., Science **239** (1988): 487-491
- Salman, B. et al., Oncoimmunology. **2** (2013): e26662
- Sangro, B. et al., J Clin Oncol **22** (2004): 1389-1397
- Savas, S. et al., PLoS.One. **6** (2011): e18306
- Schmidt, S. M. et al., Cancer Res **64** (2004): 1164-1170
- Schmitt, T. M. et al., Hum.Gene Ther. **20** (2009): 1240-1248
- Scholten, K. B. et al., Clin Immunol. **119** (2006): 135-145
- Schuetz, C. S. et al., Cancer Res **66** (2006): 5278-5286
- Seeger, F. H. et al., Immunogenetics **49** (1999): 571-576
- Sherman, F. et al., Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics (1986)
- Shi, M. et al., World J Gastroenterol. **10** (2004): 1146-1151
- Siegel, S. et al., Blood **102** (2003): 4416-4423
- Silva, L. P. et al., Anal.Chem. **85** (2013): 9536-9542
- Simmen, F. A. et al., Reprod.Biol Endocrinol. **6** (2008): 41
- Singh-Jasuja, H. et al., Cancer Immunol.Immunother. **53** (2004): 187-195
- Small, E. J. et al., J Clin Oncol. **24** (2006): 3089-3094
- Sowalsky, A. G. et al., Mol.Cancer Res. **13** (2015): 98-106
- Spaner, D. E. et al., Cancer Immunol Immunother. **54** (2005): 635-646
- Srivastava, N. et al., Cancer Manag.Res. **6** (2014): 279-289
- Stanbrough, M. et al., Cancer Res **66** (2006): 2815-2825
- Steinberg, R. L. et al., Urol.Oncol (2016a)
- Steinberg, R. L. et al., Urol.Oncol (2016b)
- Steinway, S. N. et al., PLoS.One. **10** (2015): e0128159
- Stevanovic, S. et al., J Clin Oncol **33** (2015): 1543-1550
- Stintzing, S., F1000Prime.Rep. **6** (2014): 108
- Sturm, M. et al., BMC.Bioinformatics. **9** (2008): 163
- Su, Z. et al., Cancer Res. **63** (2003): 2127-2133
- Szczepanski, M. J. et al., Oral Oncol **49** (2013): 144-151
- Szczepanski, M. J. et al., Biomark.Med. **7** (2013): 575-578
- Takayama, T. et al., Cancer **68** (1991): 2391-2396
- Takayama, T. et al., Lancet **356** (2000): 802-807
- Tan, P. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. **419** (2012): 801-808
- Tan, Q. et al., Cell Physiol Biochem. **38** (2016): 469-486
- Tanaka, F. et al., Int.J Oncol **10** (1997): 1113-1117
- Teufel, R. et al., Cell Mol Life Sci. **62** (2005): 1755-1762
- Thakkar, J. P. et al., Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev. **23** (2014): 1985-1996
- Toh, U. et al., Int.J Clin Oncol **7** (2002): 372-375

- Toh, U. et al., Clin Cancer Res. **6** (2000): 4663-4673  
Toomey, P. G. et al., Cancer Control **20** (2013): 32-42  
Tran, E. et al., Science **344** (2014): 641-645  
Triulzi, T. et al., Oncotarget. **6** (2015): 28173-28182  
Tsuchiya, T. et al., Chemotherapy **61** (2016): 77-86  
Uemura, T. et al., Cancer Sci. **101** (2010): 2404-2410  
Vici, P. et al., J Exp.Clin Cancer Res **33** (2014): 29  
von Rundstedt, F. C. et al., Transl.Androl Urol. **4** (2015): 244-253  
Walter, S. et al., J Immunol **171** (2003): 4974-4978  
Walter, S. et al., Nat Med. **18** (2012): 1254-1261  
Wang, L. et al., Cancer Res **70** (2010): 5818-5828  
Whiteland, H. et al., Clin Exp.Metastasis **31** (2014): 909-920  
Wierda, W. G. et al., Blood **118** (2011): 5126-5129  
Wilhelm, S. M. et al., Cancer Res **64** (2004): 7099-7109  
Willcox, B. E. et al., Protein Sci. **8** (1999): 2418-2423  
Wilson, P. M. et al., Nat Rev.Clin Oncol **11** (2014): 282-298  
Wittig, B. et al., Hum.Gene Ther. **12** (2001): 267-278  
World Cancer Report, (2014)  
World Health Organization, (2014), <http://www.who.int/en/>  
Yamada, A. et al., Breast Cancer Res Treat. **137** (2013): 773-782  
Yang, F. et al., Breast Cancer Res Treat. **145** (2014): 23-32  
Yao, J. et al., Cancer Immunol.Res. **2** (2014): 371-379  
Yeh, I. et al., Nat.Comm. **6** (2015): 7174  
Zaremba, S. et al., Cancer Res. **57** (1997): 4570-4577  
Zhang, W. et al., Acta Haematol. **130** (2013): 297-304  
Zou, C. et al., Cancer **118** (2012): 1845-1855  
Zufferey, R. et al., J Virol. **73** (1999): 2886-2892

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептид, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID No. 251 или его фармацевтически приемлемая соль, где указанный пептид имеет общую длину до 16 аминокислот.
2. Пептид или его соль по п. 1, где указанный пептид имеет способность связываться с молекулой МНС I или II класса, и где указанный пептид, когда он связан с указанной молекулой МНС, в состоянии распознаваться Т-клетками CD4 и/или CD8.
3. Пептид или его соль по любому из пп. 1–2, где пептид состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID No. 251.
4. Пептид или его соль по любому из пп. 1–3, где указанный пептид модифицирован и/или включает непептидные связи.
5. Пептид или его соль по любому из пп. 1–4, где указанный пептид является частью слитого белка, в частности, включающим N-терминальные аминокислоты антиген-ассоциированной инвариантной цепи (Ii) HLA-DR.
6. Применение пептида по любому из пп. 1-5 в производстве лекарственного средства против рака.
7. Антитело, растворимое или связанное с мембраной, которое специфически распознает пептид по любому из пп. 1–4, или пептид по любому из пп. 1–4, когда он связан с молекулой МНС.
8. Т-клеточный рецептор (ТКР), реагирующий с HLA-лигандом, когда он связан с молекулой МНС, где указанный лиганд представляет собой пептид по любому из пп. 1-4.

9. Нуклеиновая кислота, кодирующая пептид по любому из пп. 1–3 или 5, или ТКР по п. 8.
10. Нуклеиновая кислота по п. 9, которая необязательно связана с гетерологичной последовательностью промотора.
11. Рекомбинантная клетка-хозяин, включающая пептид по любому из пп. 1–5 или нуклеиновую кислоту по пп. 9 или 10.
12. Рекомбинантная клетка-хозяин по п. 11, где клетка-хозяин
  - (a) содержит пептид по любому из пп. 1-5 или нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид по любому из пп. 1-3 или 5, где указанная клетка-хозяин является антигенпрезентирующей клеткой, такой как дендритная клетка, или
  - (b) содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую ТКР по п. 8, где указанная клетка-хозяин является Т-клеткой или НК-клеткой.
13. Способ получения пептида по любому из пп. 1–3 или 5, где способ включает культивирование клетки-хозяина по п. 11, которая презентует пептид по любому из пп. 1–3 или 5 или экспрессирует нуклеиновую кислоту по п. 9 или 10, которая кодирует пептид по любому из пп. 1-3 или 5, и выделение пептида или его варианта из клетки-хозяина или его культуральной среды.
14. Способ получения активированных Т-лимфоцитов *in vitro*, где способ включает контактирование Т-клеток *in vitro* с нагруженными антигеном молекулами МНС человека I или II класса, экспрессированными на поверхности подходящей антигенпрезентирующей клетки или искусственной конструкции, имитирующей антигенпрезентирующую клетку, на период времени, достаточный для активации указанных Т-клеток антиген-специфическим образом, где указанный антиген является пептидом по любому из пп. 1–3.

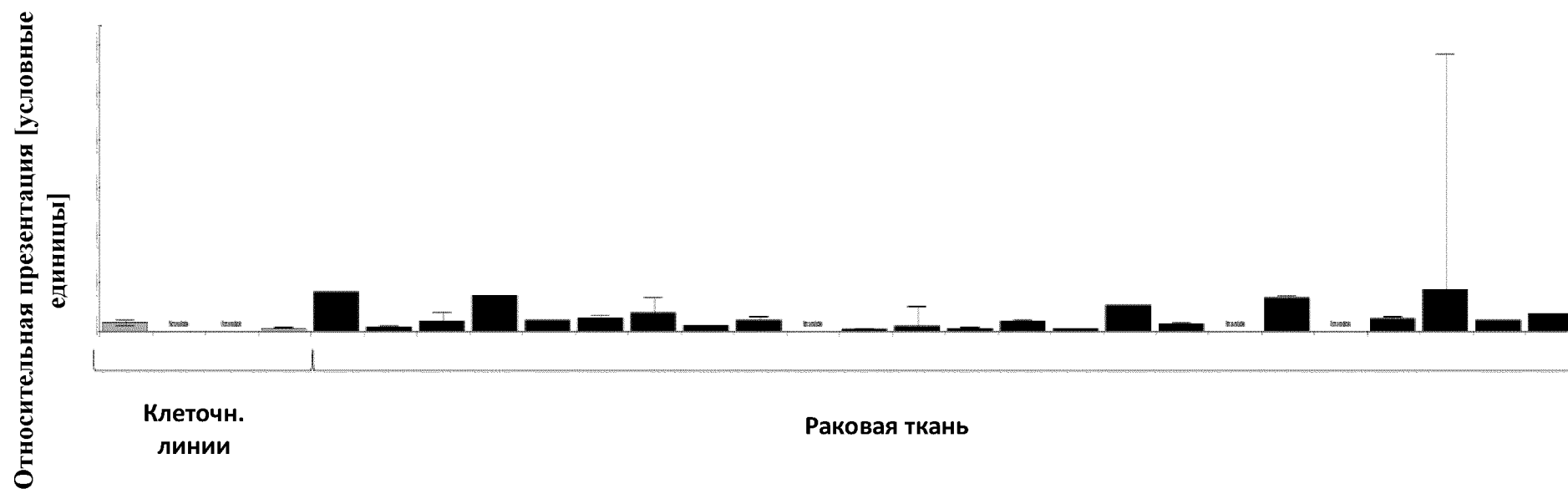
15. Активированный Т-лимфоцит, полученный с помощью способа по п. 14, который селективно распознает клетку, которая презентрует полипептид, включающий аминокислотную последовательность, указанную в любом из пп. 1–3.
16. Применение нуклеиновой кислоты по п. 9 или 10, клетки по п. 11 или активированного Т-лимфоцита по п. 15 в производстве лекарственного средства против рака.
17. Способ диагностики рака у субъекта, где способ, включает введение антитела по п. 7 или ТКР по п. 8 субъекту или образцу от субъекта, при котором ТКР или антитело маркируется зондом или радионуклеотидом, способ, включает обнаружение связывания ТКР или антитела с тканью испытуемого.
18. Применение по п. 6 или 16 или метод по п. 17, где указанное раковое заболевание выбрано из группы: глиобластома (ГБ), рак молочной железы (РМЖ), колоректальный рак (КРК), почечноклеточная карцинома (ПКК), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), гепатоклеточная карцинома (ГКК), немелкоклеточный и мелкоклеточный рак легких (НМРЛ, МРЛ), неходжкинская лимфома (НХЛ), острый миелолейкоз (ОМЛ), рак яичника (РЯ), рак поджелудочной железы (РПЖ), рак предстательной железы (РПрЖ), рак пищевода, в том числе рак пищеводно-желудочного перехода (РП), рак желчного пузыря и холангиокарцинома (РЖП, ХК), меланома (МЕЛ), рак желудка (РЖ), рак мочевого пузыря (РМП) и рак матки (РЭМ) и другие опухоли, при которых наблюдается чрезмерная экспрессия пептида по п. 1.
19. Комплект для лечения рака, включающий:
  - (а) контейнер, включающий фармацевтическую композицию, содержащую пептид(ы) или соль по любому из пп. 1–5, нуклеиновую(ые) кислоту(ы) по п. 9 или 10, клетку(и) по п. 11, активированный(ые) Т-лимфоцит(ы) по п. 15 или антитело по п. 7 в виде раствора или в лиофилизированной форме; и

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

20. Фармацевтическая композиция для лечения рака, включающая пептид по п. 1 и фармацевтически приемлемый носитель.
21. Фармацевтическая композиция для лечения рака, включающая ТКР по п. 8 и фармацевтически приемлемый носитель.

Фигура 1А

Пептид: GLIAGVVSИ (A\*02)  
SEQ ID NO: 2



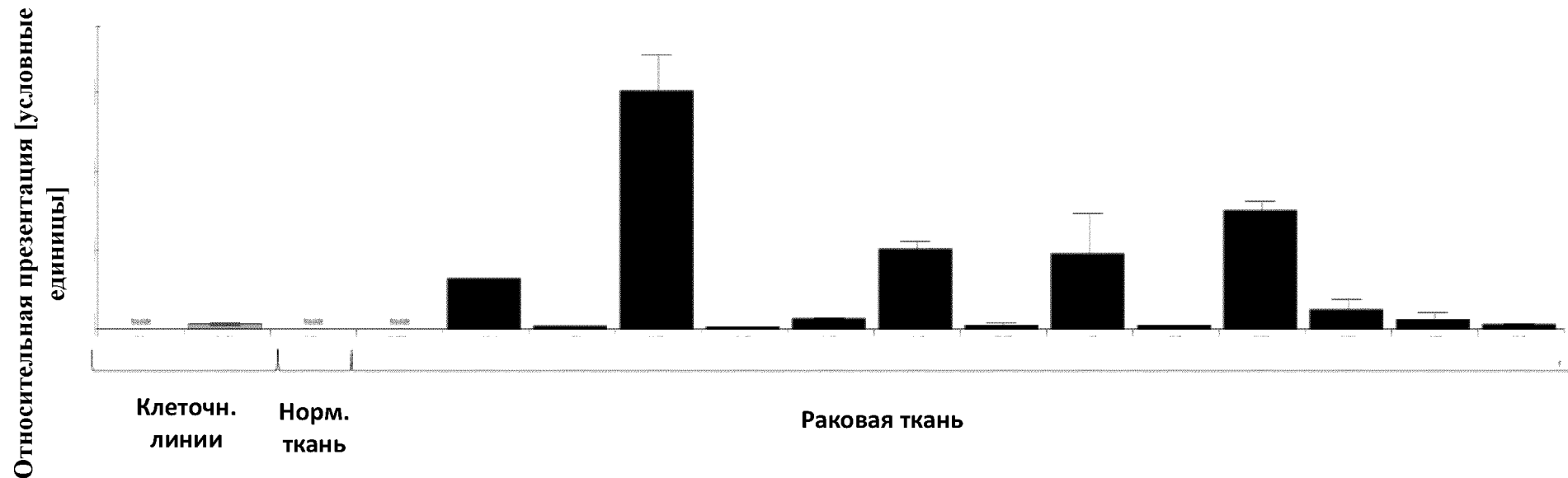
Пептид, выявленный на

4 клеточных линиях (1 почка, 2 поджелудочные железы, 1 меланома), 24 раковых тканях (1 рак головного мозга, 1 рак желчного пузыря, 7 раков почек, 1 рак прямой кишки, 1 рак печени, 7 раков легких, 2 рака желудка, 4 рака мочевого пузыря (слева направо))

Фигура 1В

Пептид: GLLFSLRSV (A\*02)

SEQ ID NO: 92



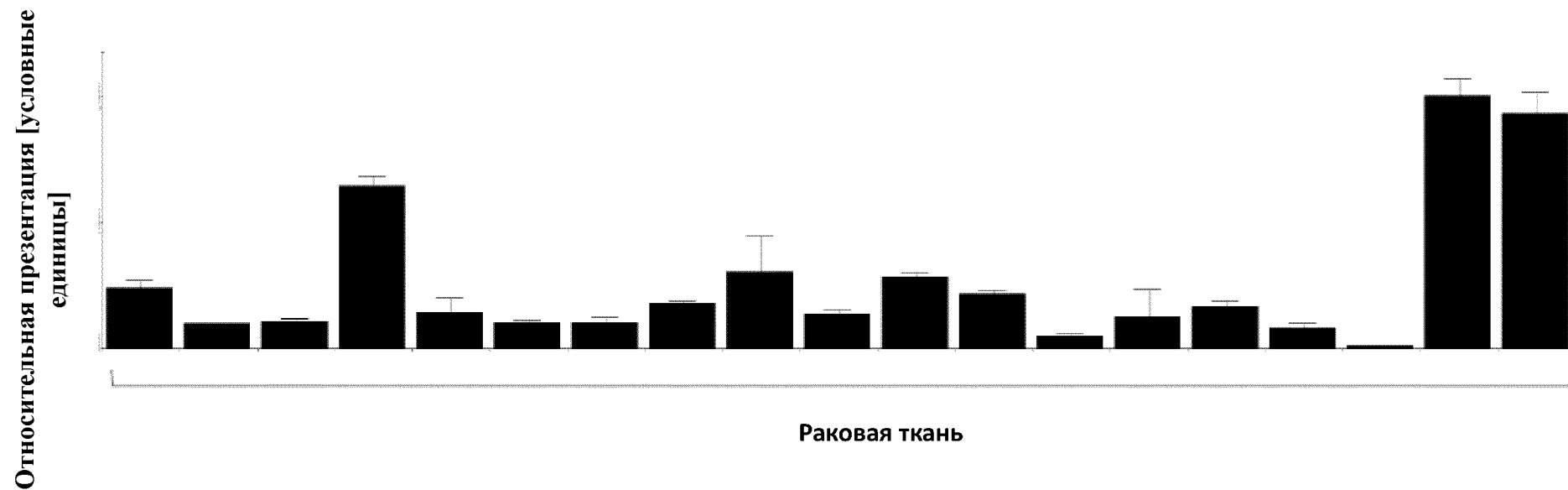
Пептид, выявленный на

2 клеточных линиях (2 поджелудочные железы), 1 нормальной ткани (1 лимфатический узел), 14 раковых тканях (4 лейкоцитарных лейкоза, 2 рака миелоидных клеток, 1 рак костного мозга, 1 рак молочной железы, 1 рак лимфатических узлов, 1 рак яичника, 2 рака предстательной железы, 1 рак кожи, 1 рак мочевого пузыря) (слева направо)

Фигура 1С

Пептид: HYSQELSLLYL (A\*24)

SEQ ID NO: 158



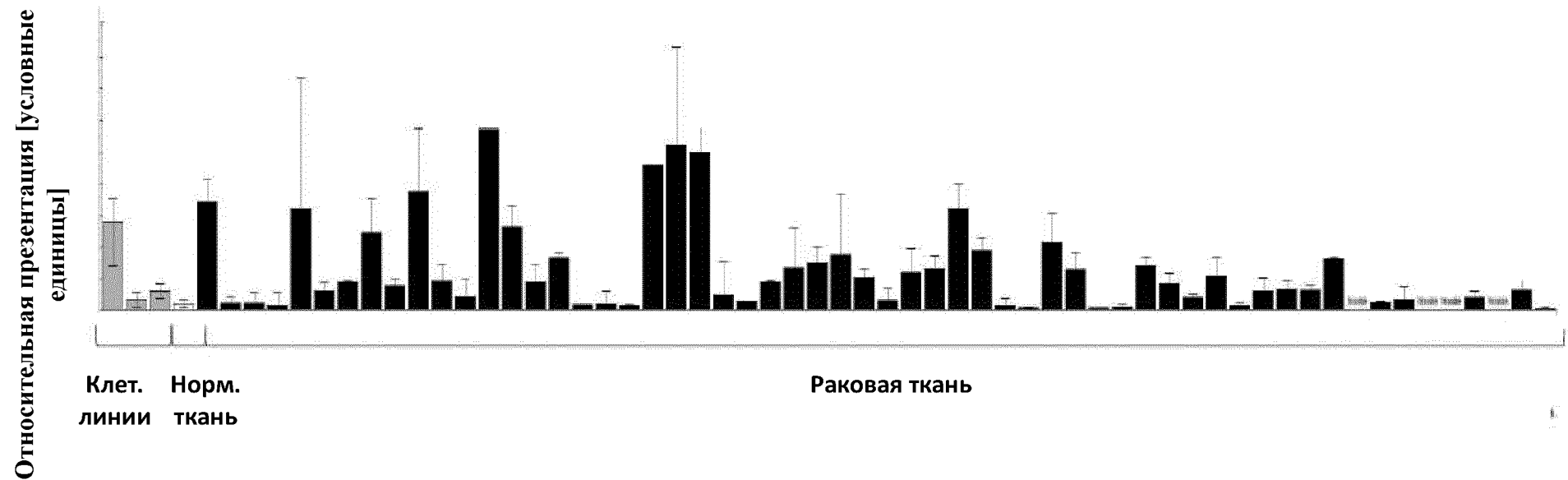
Пептид, выявленный на

19 раковых тканях (1 рак головного мозга, 1 рак почек, 2 рака печени, 9 раков легких, 2 рака предстательной железы, 4 рака желудка) (слева направо)

Фигура 1D

Пептид: TYSVSFPMF (A\*24)

SEQ ID NO: 195



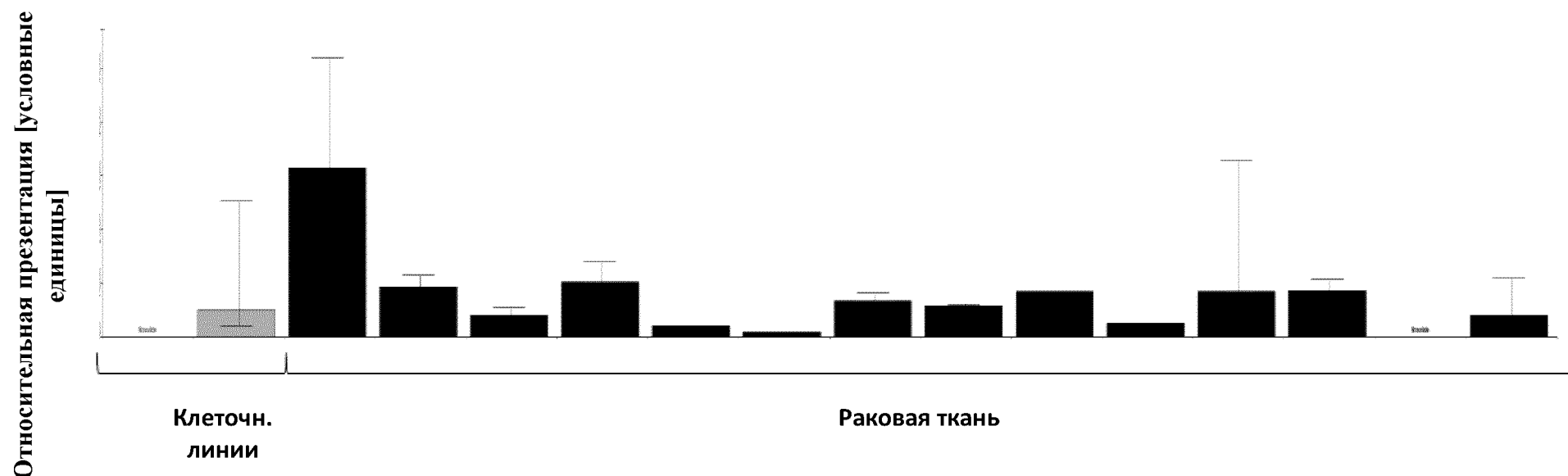
Пептид, выявленный на

3 клеточных линиях (3 доброкачественные гиперплазии предстательной железы), 1 нормальной ткани (1 желудок), 58 раковых тканях (1 рак головного мозга, 2 рака печени, 47 раков легких, 7 раков предстательной железы, 1 рак желудка) (слева направо)

Фигура 1Е

Пептид: SIYQFLIAV (A\*02)

SEQ ID NO: 8



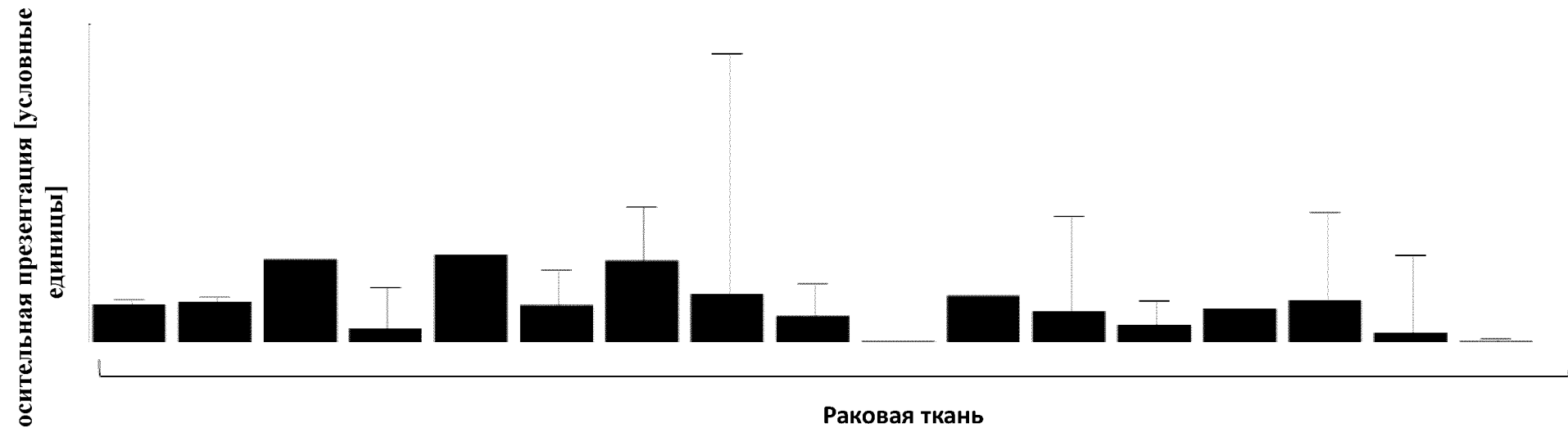
Пептид, выявленный на

2 клеточных линиях (1 линия клеток крови, 1 поджелудочная железа), 14 раковых тканях (3 лейкоцитарных лейкоза, 1 рак миелоидных клеток, 1 рак молочной железы, 1 рак желчного пузыря, 1 рак головы и шеи, 1 рак толстой кишки, 2 рака легких, 3 рака лимфатических узлов, 1 рак матки) (слева направо)

Фигура 1F

Пептид: ALMAMLVYV (A\*02)

SEQ ID NO: 13



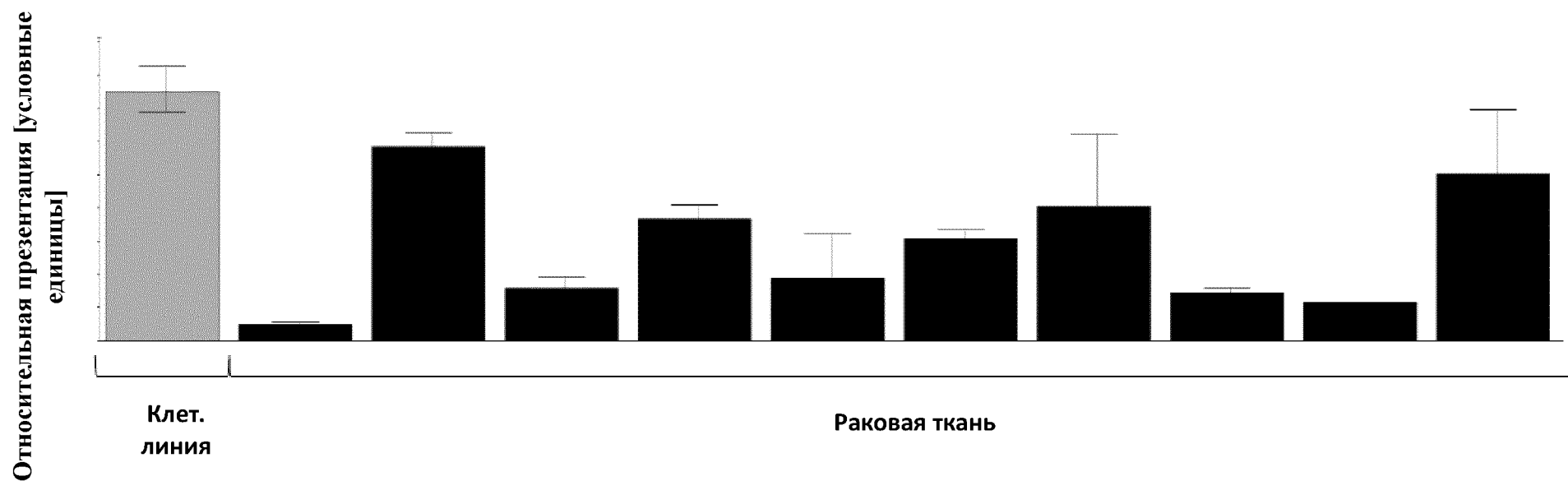
Пептид, выявленный на

17 раковых тканях (1 рак желчных протоков, 2 рака молочной железы, 1 рак желчного пузыря, 3 рака головы и шеи, 7 раков легких, 1 рак лимфатических узлов, 1 рак яичника, 1 рак желудка) (слева направо)

Фигура 1G

Пептид: ALAPHLDDA (A\*02)

SEQ ID NO: 237



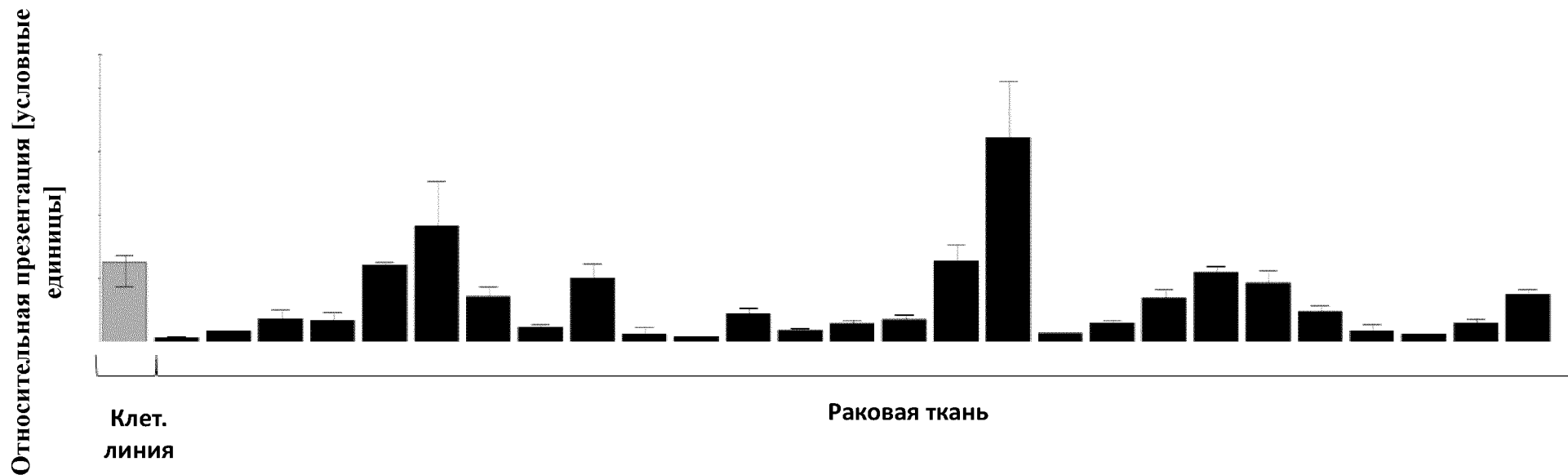
Пептид, выявленный на

1 клеточной линии (клетки крови), 10 раковых тканях (1 рак миелоидных клеток, 2 рака головного мозга, 1 рак молочной железы, 1 рак легких, 1 рак яичника, 1 рак кожи, 1 рак мочевого пузыря, 2 рака матки) (слева направо)

Фигура 1Н

Пептид: ILLPRIIEA (A\*02)

SEQ ID NO: 259



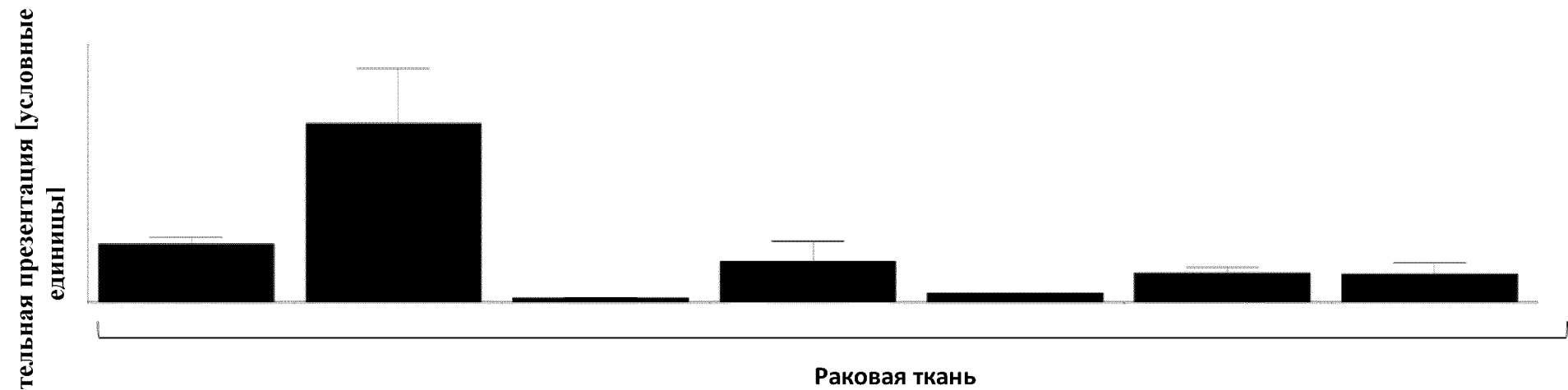
Пептид, выявленный на

1 клеточной линии (1 поджелудочная железа), 27 раковых тканях (3 лейкоцитарных лейкоза, 1 рак головного мозга, 2 рака молочной железы, 3 рака головы и шеи, 1 рак толстой кишки, 1 рак прямой кишки, 6 раков легких, 5 раков яичника, 1 рак поджелудочной железы, 2 рака кожи, 1 рак желудка, 1 рак матки) (слева направо)

Фигура 1I

Пептид: HLLEGSVGV (A\*02)

SEQ ID NO: 39



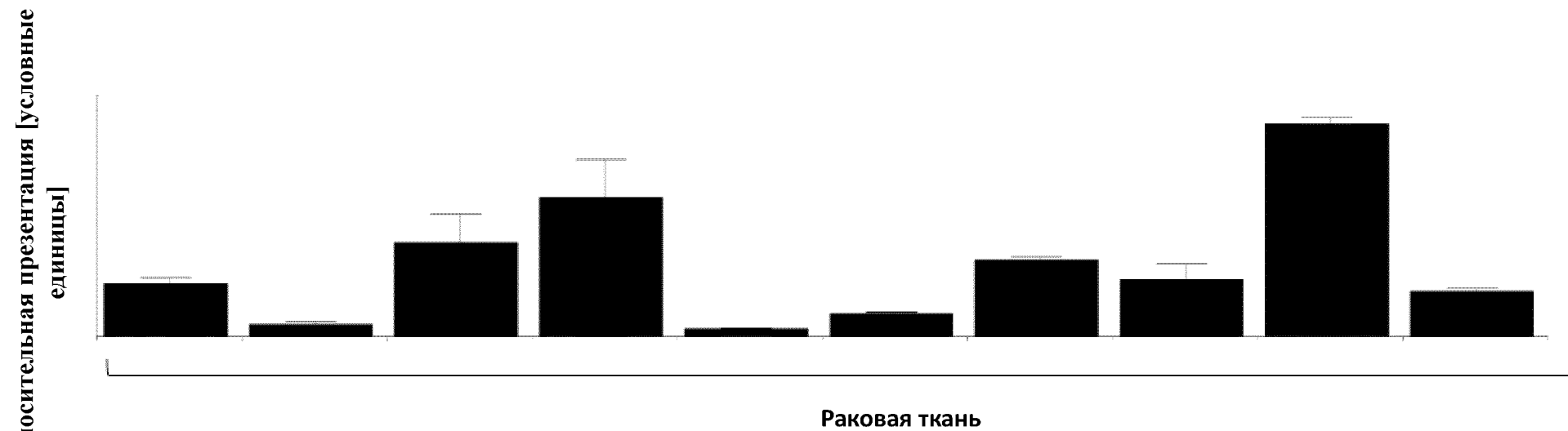
Пептид, выявленный на

7 раковых тканях (5 раков молочной железы, 1 рак печени, 1 рак кожи) (слева направо)

Фигура 1J

Пептид: VQLDSIEDLEV (A\*02)

SEQ ID NO: 32



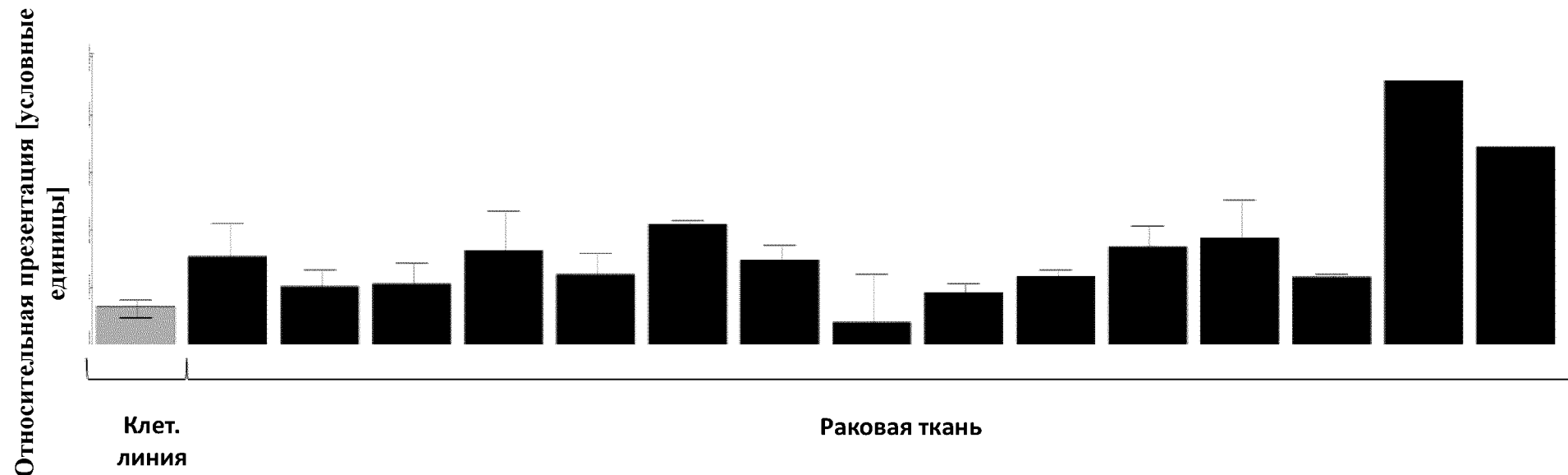
Пептид, выявленный на

10 раковых тканях (1 лейкоцитарный лейкоз, 1 рак легких, 4 рака яичника, 3 рака кожи, 1 рак матки) (слева направо)

Фигура 1К

Пептид: FYSRLLQKF (A\*24)

SEQ ID NO: 203



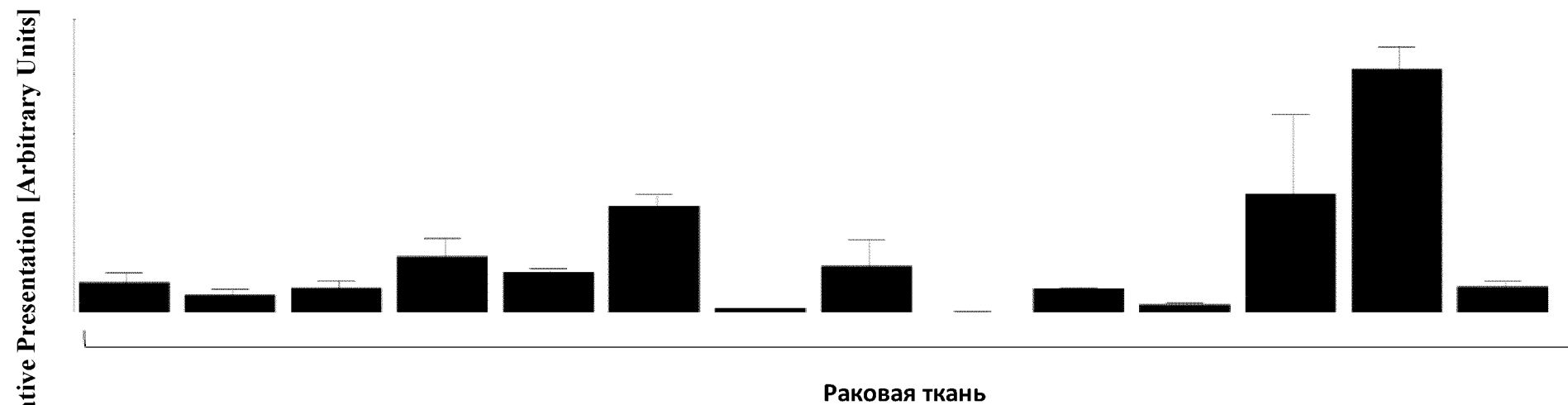
Пептид, выявленный на

1 клеточной линии (1 доброкачественная гиперплазия предстательной железы) 15 раковых тканях (13 раков легких, 2 рака желудка) (слева направо)

Фигура 1L

Пептид: NYEEVHKELF (A\*24)

SEQ ID NO: 270



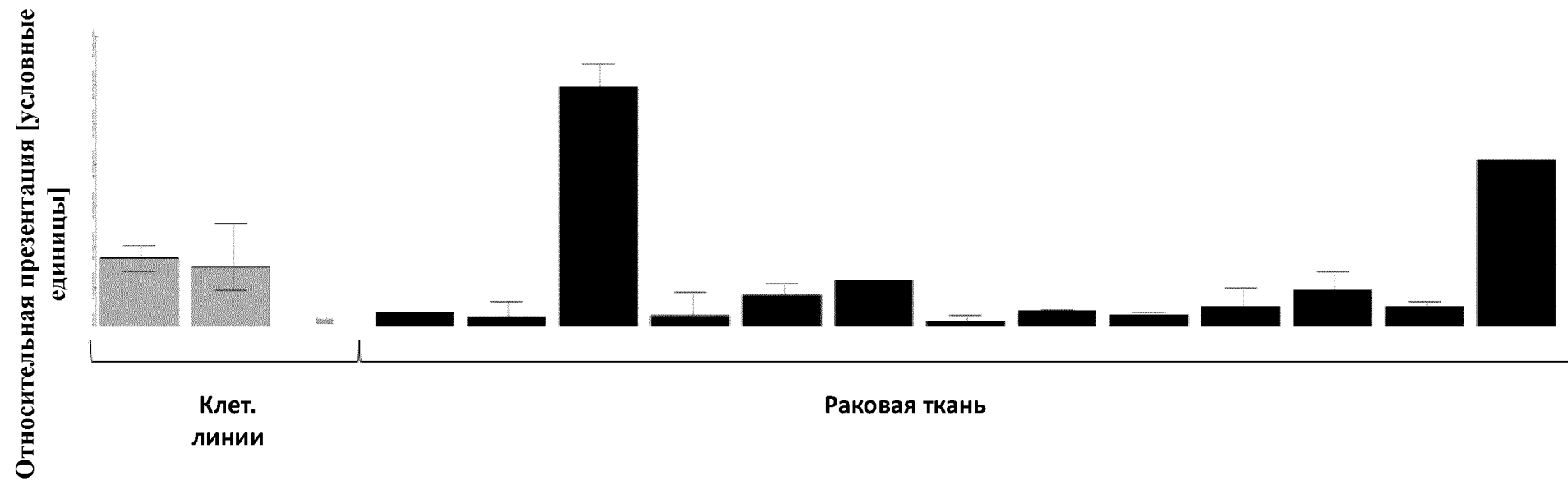
Пептид, выявленный на

14 раковых тканях (1 рак головного мозга, 11 раков легких, 2 рака желудка) (слева направо)

Фигура 1М

Пептид: KFSSFSLFF (A\*24)

SEQ ID NO: 164

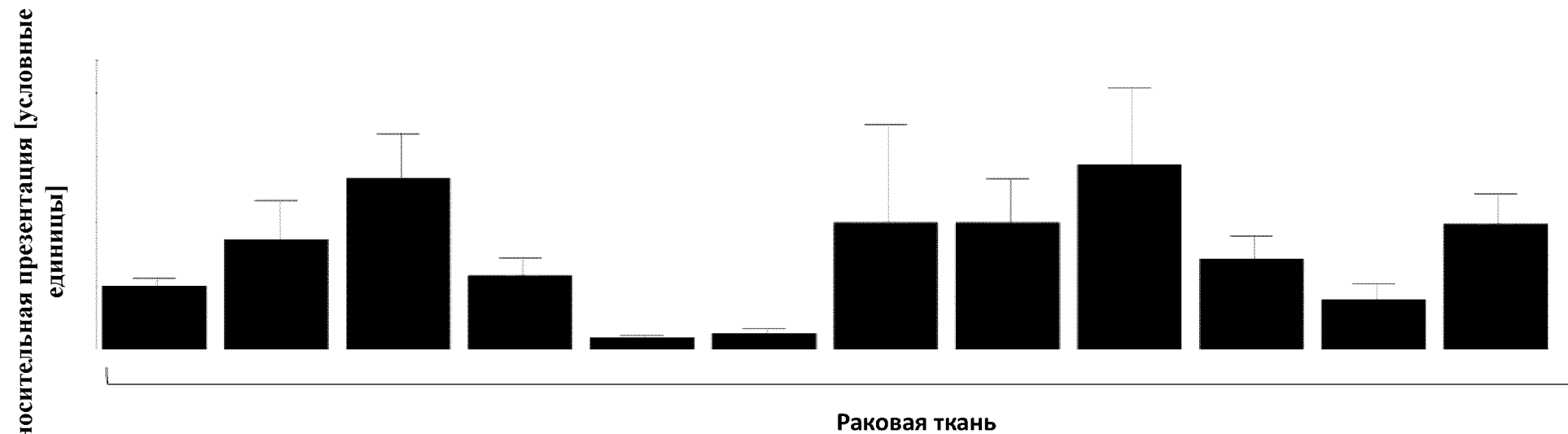


Пептид, выявленный на  
2 клеточных линиях (2 доброкачественные гиперплазии предстательной железы) 14 раковых тканях (11 раков легких, 1 рак предстательной железы, 2 рака желудка) (слева направо)

Фигура 1N

Пептид: LYITERPKTI (A\*24)

SEQ ID NO: 287

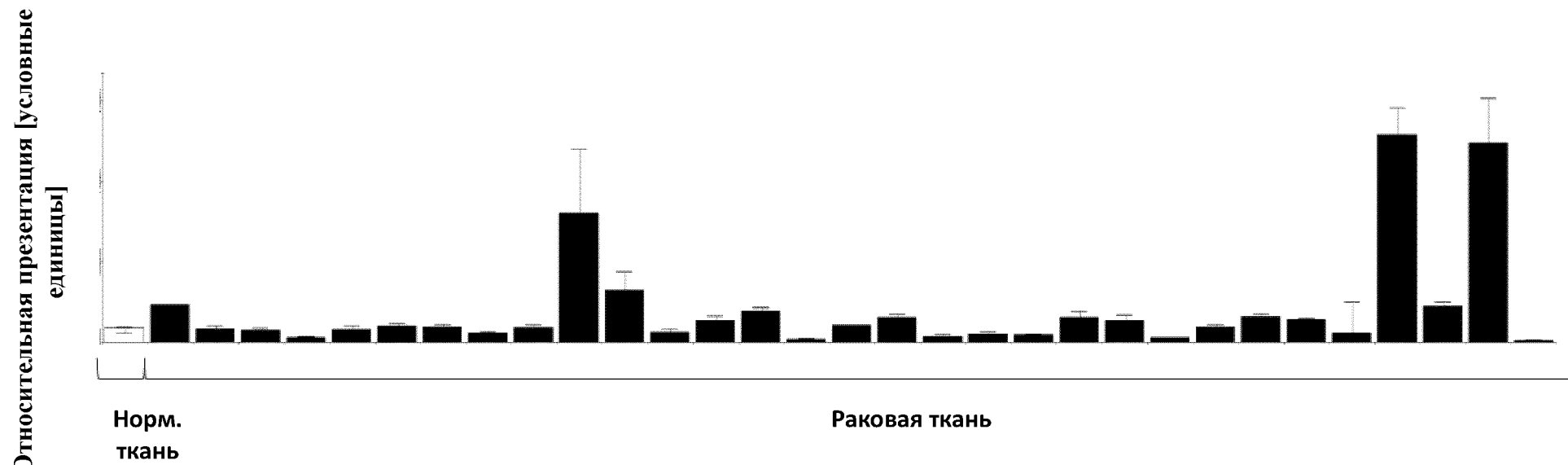


Пептид, выявленный на

12 раковых тканях (3 рака головного мозга, 1 рак печени, 7 раков легких, 1 рак желудка) (слева направо)

Фигура 10

Пептид: RYISDQLFTNF (A\*24)  
SEQ ID NO: 278



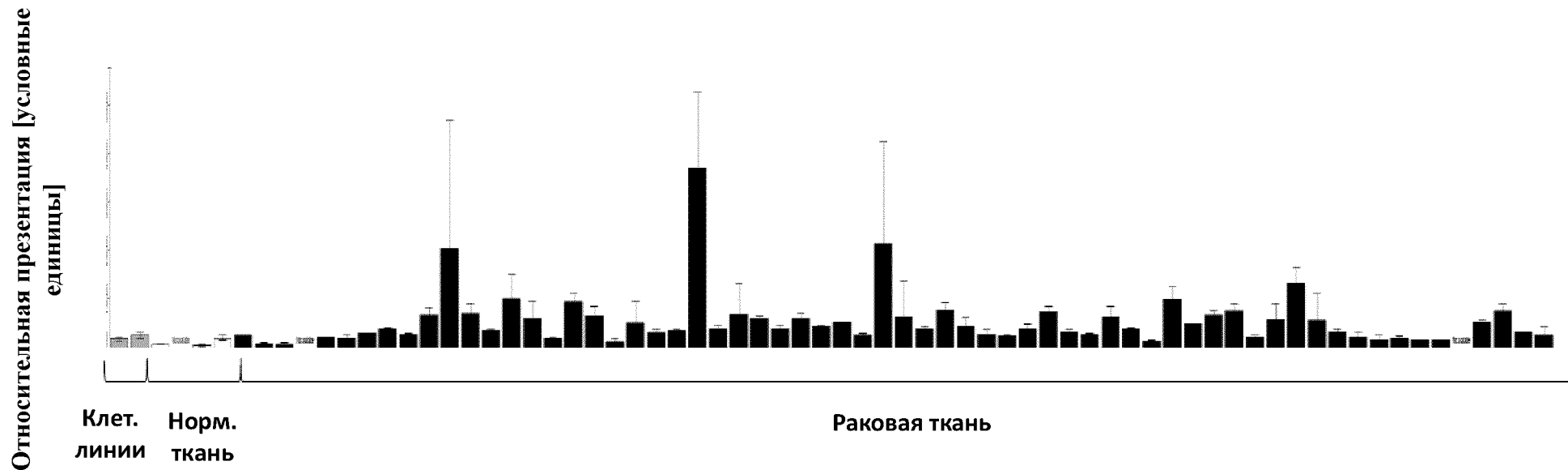
Пептид, выявленный на

1 нормальной ткани (1 легкое), 31 раковой ткани (2 рака головного мозга, 1 рак почек, 2 рака печени, 20 раков легких, 2 рака предстательной железы, 4 рака желудка) (слева направо)

Фигура 1Р

Пептид: VYQGHTALL (A\*24)

SEQ ID NO: 277

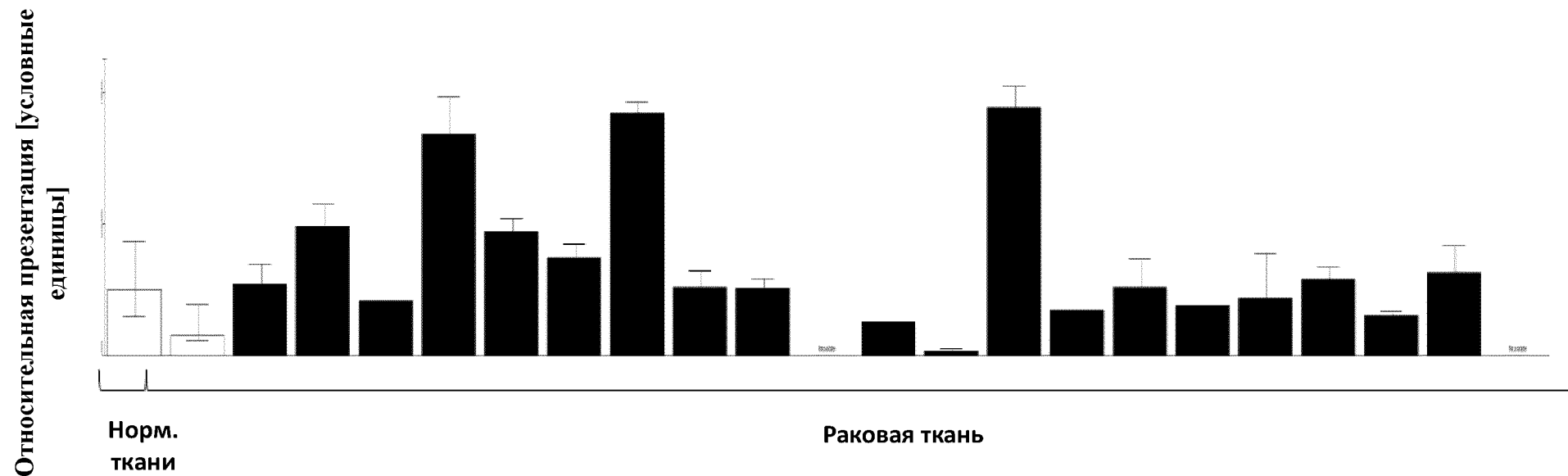


Пептид, выявленный на

2 клеточных линиях (2 доброкачественные гиперплазии предстательные железы), 4 нормальных тканях (1 прямая кишка, 2 легких, 1 поджелудочная железа), 64 раковых тканях (5 раков головного мозга, 48 раков легких, 6 раков предстательной железы, 5 раков желудка) (слева направо)

Фигура 1Q

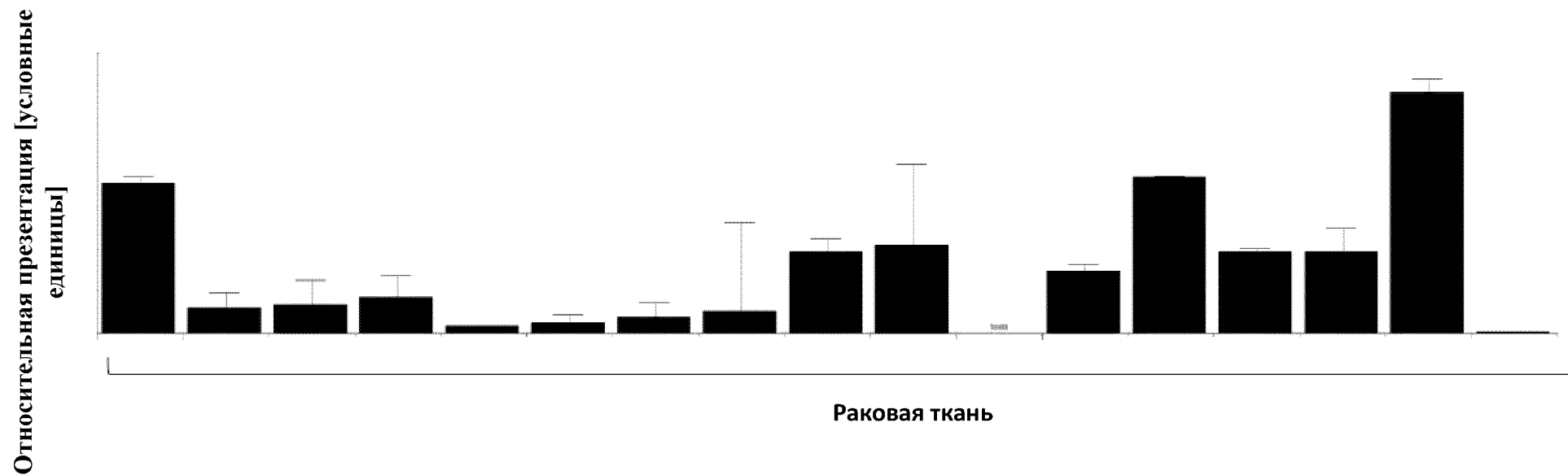
Пептид: VYVSDIQEL (A\*24)  
SEQ ID NO: 288



Пептид, выявленный на  
2 нормальных тканях (1 толстая кишка, 1 гипофиз), 21 раковой ткани (1 рак печени, 14 раков легких, 1 рак предстательной железы, 5 раков желудка) (слева направо)

Фигура 1R

Пептид: VYTL DIPVL (A\*24)  
SEQ ID NO: 160

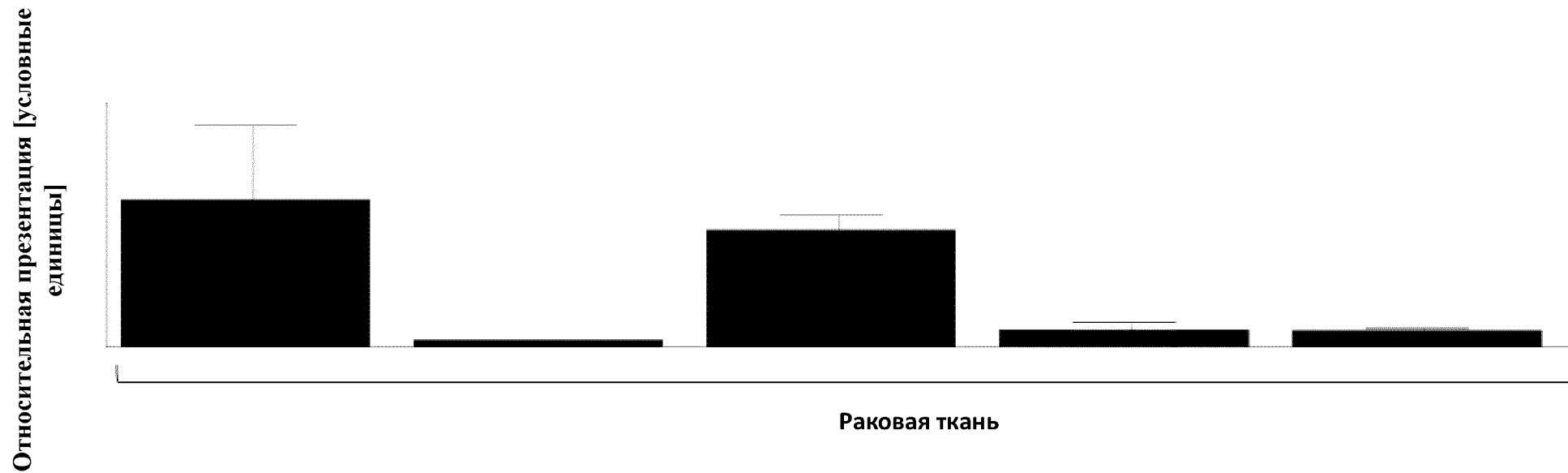


Пептид, выявленный на  
17 раковых тканях (1 рак печени, 9 раков легких, 1 рак предстательной железы, 6 раков желудка) (слева направо)

Фигура 1S

Пептид: KLFTSVFGV (A\*02)

SEQ ID NO: 305

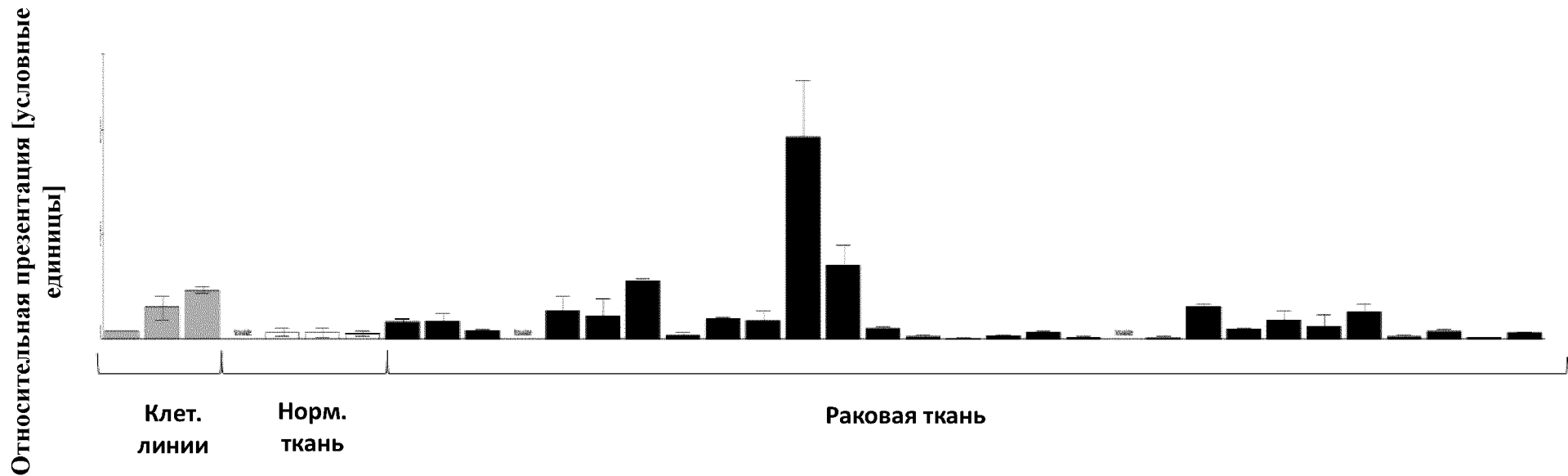


Пептид, выявленный на  
5 раковых тканях (5 раков клеток крови) (слева направо)

Фигура 1Т

Пептид: ALLSSLNEL (A\*02)

SEQ ID NO: 306



Пептид, выявленный на

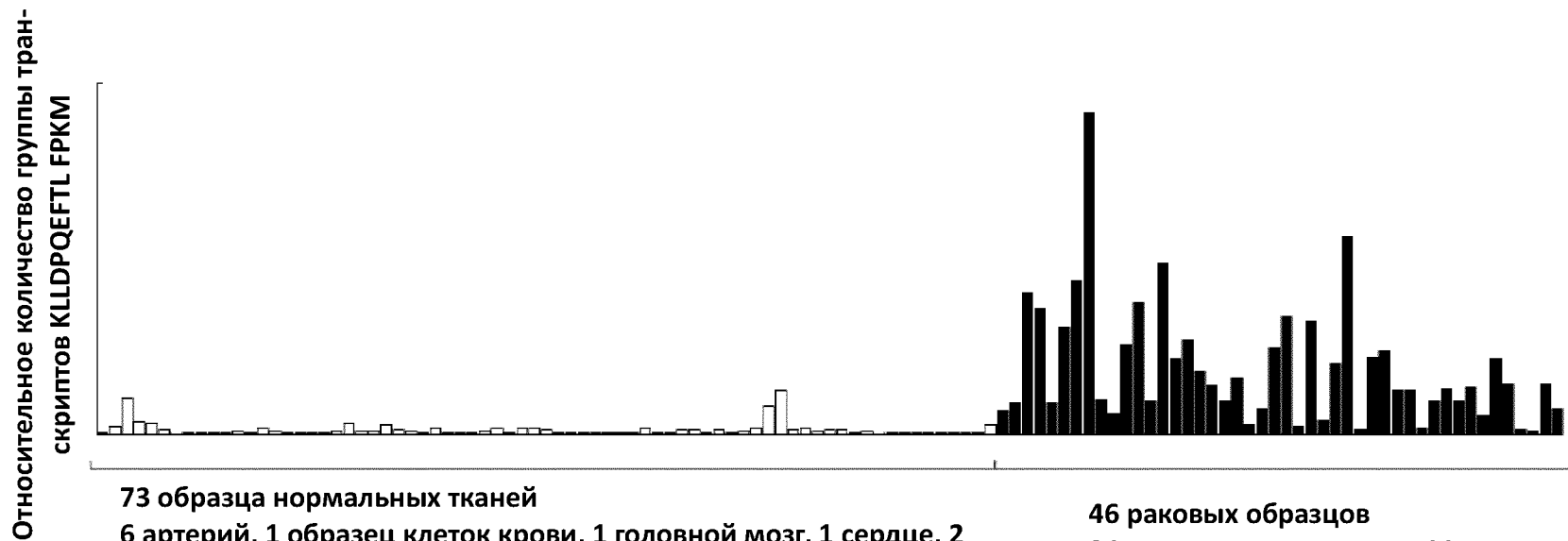
3 клеточных линиях (1 почка, 2 предстательные железы), 4 нормальных тканях (1 печень, 1 легкое, 1 яичник, 1 матка), 29 раковых тканях (1 рак желчных протоков, 2 рака клеток крови, 1 рак головного мозга, 3 рака молочной железы, 1 рак почек, 5 раков печени, 1 рак легких, 1 рак лимфатических узлов, 4 рака яичника, 6 раков предстательной железы, 1 рак мочевого пузыря, 3 рака матки) (слева направо)

Фигура 2А

Ген: TNC

Пептид: KLLDPQEFTL

SEQ ID NO: 59



6 артерий, 1 образец клеток крови, 1 головной мозг, 1 сердце, 2 печени, 2 легких, 2 вены, 1 жировая ткань, 1 надпочечная железа, 6 костных мозгов, 1 хрящевая ткань, 1 толстая кишка, 1 пищевод, 2 глаза, 2 желчных пузыря, 1 почка, 6 лимфатических узлов, 5 поджелудочных желез, 2 гипофиза, 1 прямая кишка, 1 слюнная железа, 1 скелетная мышца, 1 кожа, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 щитовидная железа, 7 трахей, 1 мочевого пузыря, 1 молочная железа, 5 яичников, 3 плаценты, 1 предстательная железа, 1 семенник, 1 вилочковая железа, 1 матка

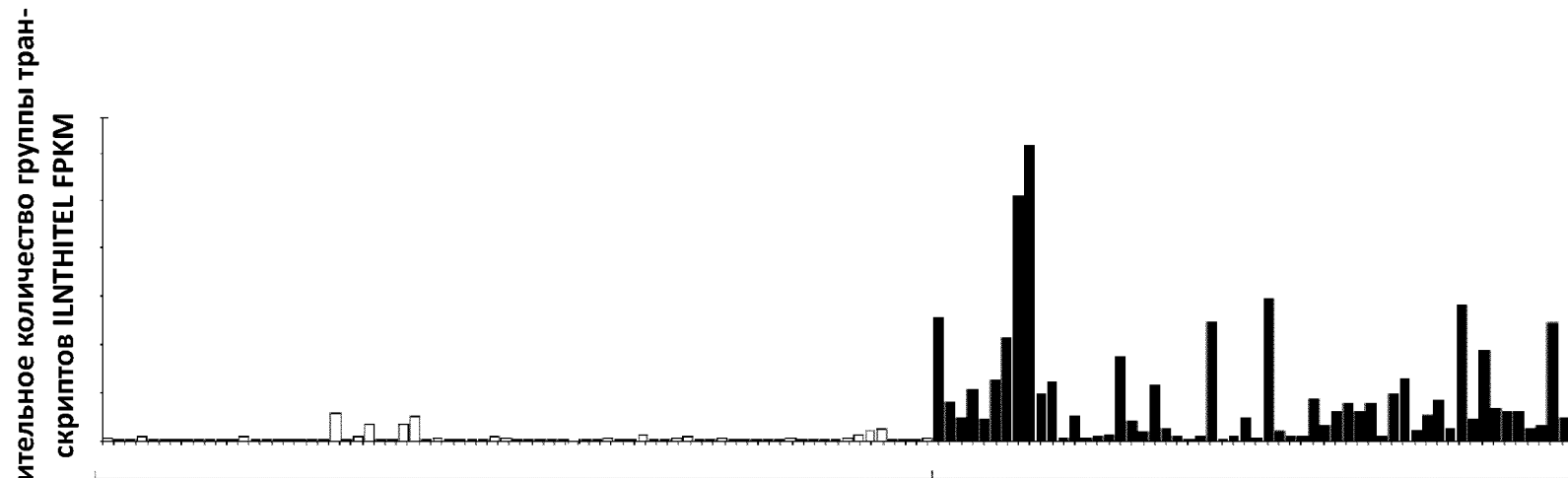
24 рака головного мозга, 11 раков легких, 11 раков пищевода

Фигура 2B

Ген: LRRC15

Пептид: ILNTHITEL

SEQ ID NO: 149

**73 образца нормальных тканей**

6 артерий, 1 образец клеток крови, 1 головной мозг, 1 сердце, 2 печени, 2 легких, 2 вены, 1 жировая ткань, 1 надпочечная железа, 6 костных мозгов, 1 хрящевая ткань, 1 толстая кишка, 1 пищевод, 2 глаза, 2 желчных пузыря, 1 почка, 6 лимфатических узлов, 5 поджелудочных желез, 2 гипофиза, 1 прямая кишка, 1 слюнная железа, 1 скелетная мышца, 1 кожа, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 щитовидная железа, 7 трахей, 1 мочевого пузыря, 1 молочная железа, 5 яичников, 3 плаценты, 1 предстательная железа, 1 семенник, 1 вилочковая железа, 1 матка

**56 раковых образцов**

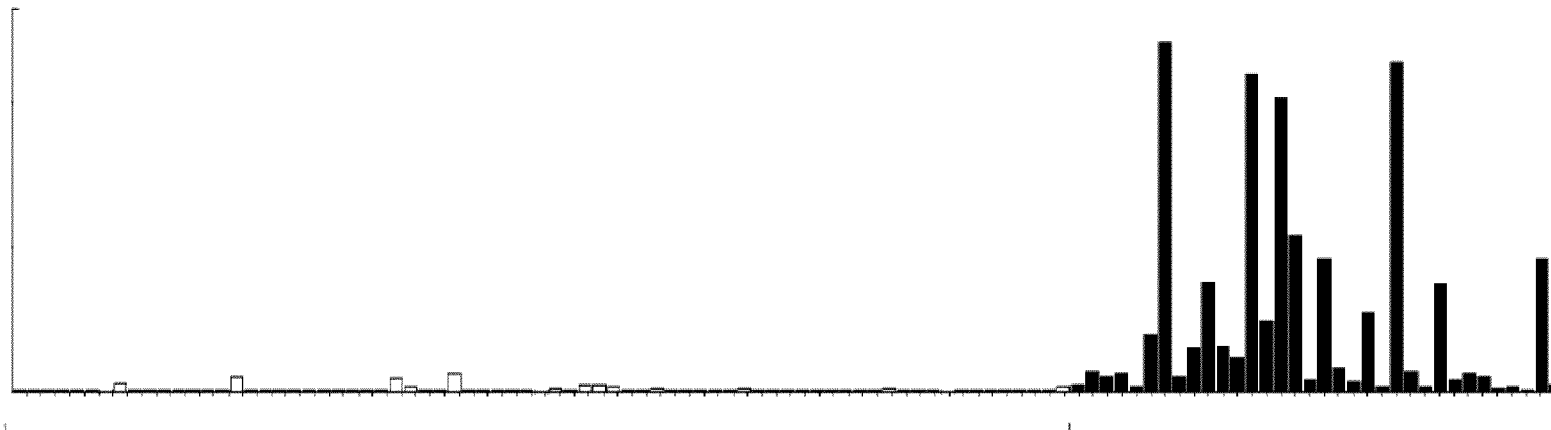
10 раков молочной железы, 3 рака желчного пузыря, 11 раков желудка, 10 раков лимфатических узлов, 11 раков легких, 11 раков пищевода

Фигура 2С

Ген: C1QL1

Пептид: TYTTVPRVAF

SEQ ID NO: 172

Относительное количество группы тран-  
скриптов TYTTVPRVAF FPKM**73 образца нормальных тканей**

6 артерий, 1 образец клеток крови, 1 головной мозг, 1 сердце, 2 печени, 2 легких, 2 вены, 1 жировая ткань, 1 надпочечная железа, 6 костных мозгов, 1 хрящевая ткань, 1 толстая кишка, 1 пищевод, 2 глаза, 2 желчных пузыря, 1 почка, 6 лимфатических узлов, 5 поджелудочных желез, 2 гипофиза, 1 прямая кишка, 1 слюнная железа, 1 скелетная мышца, 1 кожа, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 щитовидная железа, 7 трахей, 1 мочевого пузыря, 1 молочная железа, 5 яичников, 3 плаценты, 1 предстательная железа, 1 семенник, 1 вилочковая железа, 1 матка

**34 раковых образца**

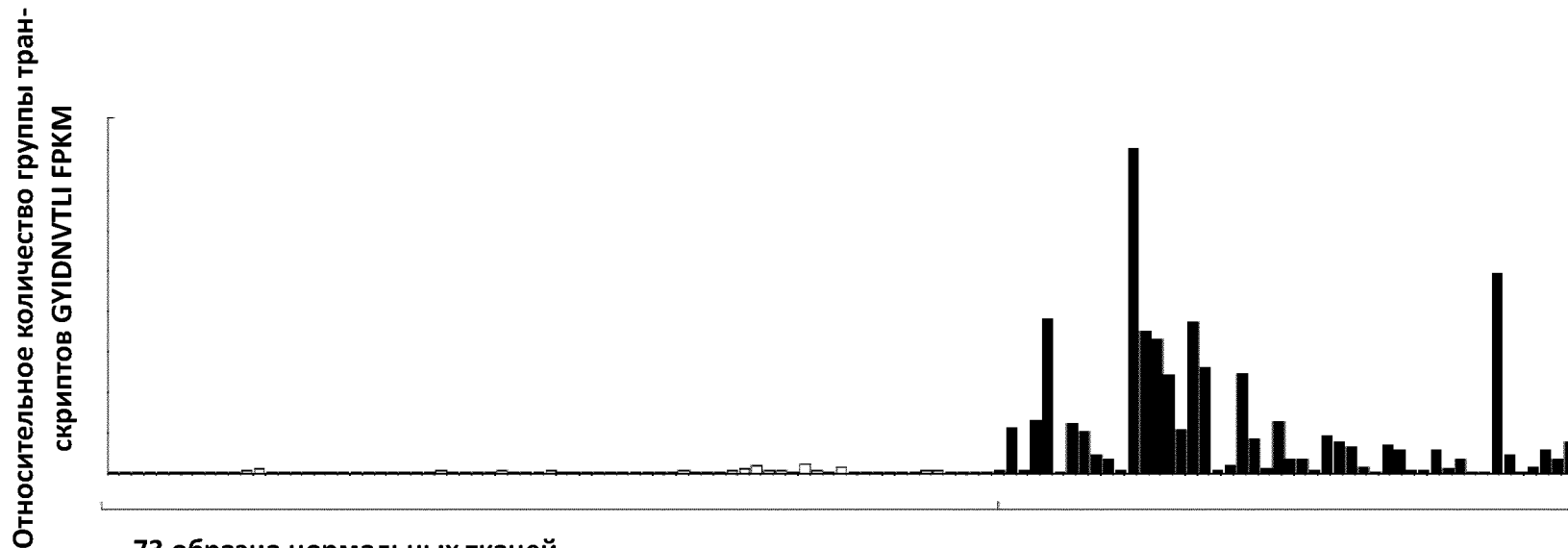
24 рака головного мозга, 10 раков почек

Фигура 2D

Ген: LAMC2

Пептид: GYIDNVTLI

SEQ ID NO: 220

**73 образцов нормальных тканей**

6 артерий, 1 образец клеток крови, 1 головной мозг, 1 сердце, 2 печени, 2 легких, 2 вены, 1 жировая ткань, 1 надпочечная железа, 6 костных мозгов, 1 хрящевая ткань, 1 толстая кишка, 1 пищевод, 2 глаза, 2 желчных пузыря, 1 почка, 6 лимфатических узлов, 5 поджелудочных желез, 2 гипофиза, 1 прямая кишка, 1 слюнная железа, 1 скелетная мышца, 1 кожа, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 щитовидная железа, 7 трахей, 1 мочевого пузырь, 1 молочная железа, 5 яичников, 3 плаценты, 1 предстательная железа, 1 семенник, 1 вилочковая железа, 1 матка

**48 раковых образцов**

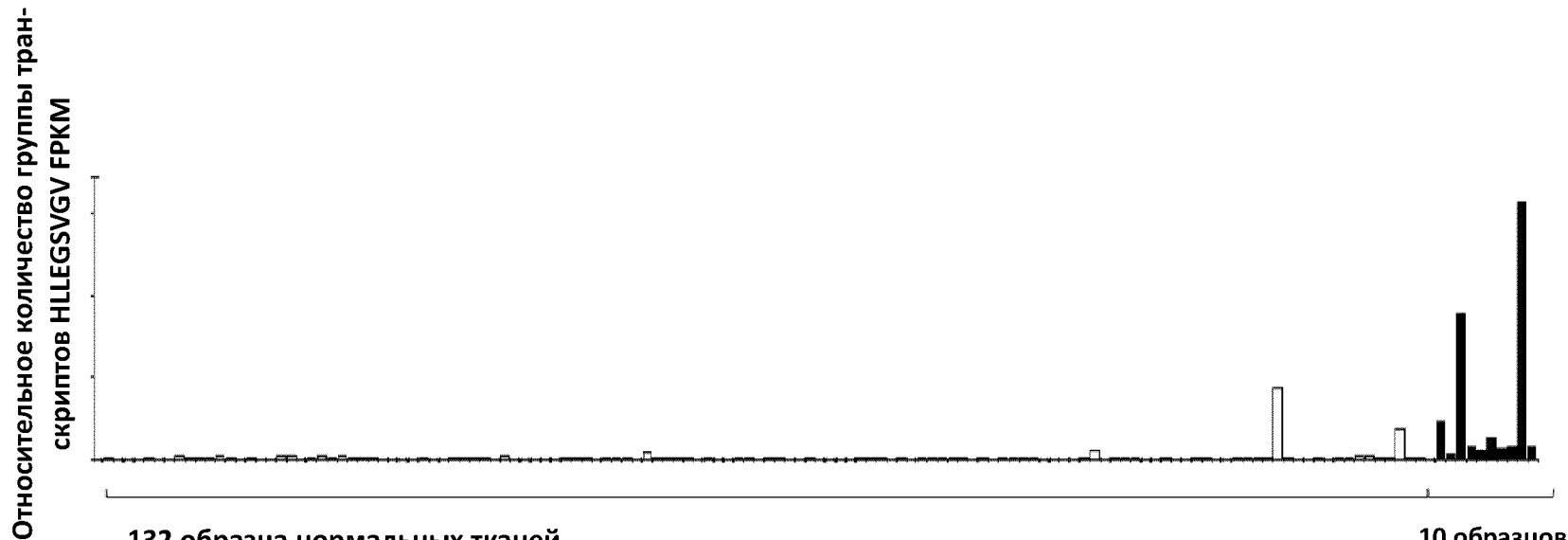
11 раков легких, 11 раков пищевода, 26 раков поджелудочной железы

Фигура 2Е

Ген: ABCC11

Пептид: HLLEGSVGV

SEQ ID NO: 39



132 образца нормальных тканей

6 артерий, 2 образца клеток крови, 6 головных мозгов, 4 сердца, 8 печеней, 6 легких, 2 вены, 1 жировая ткань, 5 надпочечных желез, 1 желчный проток, 5 костных мозгов, 1 хрящевая ткань, 1 грудная стенка и скелетная мышца, 1 толстая кишка, 5 пищеводов, 2 глаза, 2 желчных пузыря, 8 голов и шей, 5 голов и шей и слюнных желез, 1 почка, 6 лимфатических узлов, 4 поджелудочные железы, 3 паращитовидные железы, 2 периферических нерва, 3 брюшины, 2 гипофиза, 3 плевры, 1 прямая кишка, 1 скелетная мышца, 2 кожи, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 щитовидная железа, 7 трахей, 5 мочеточников, 1 мочевого пузыря, 1 молочная железа, 5 яичников, 5 плацент, 1 предстательная железа, 1 семенник, 2 вилочковые железы, 1 матка

10 образцов

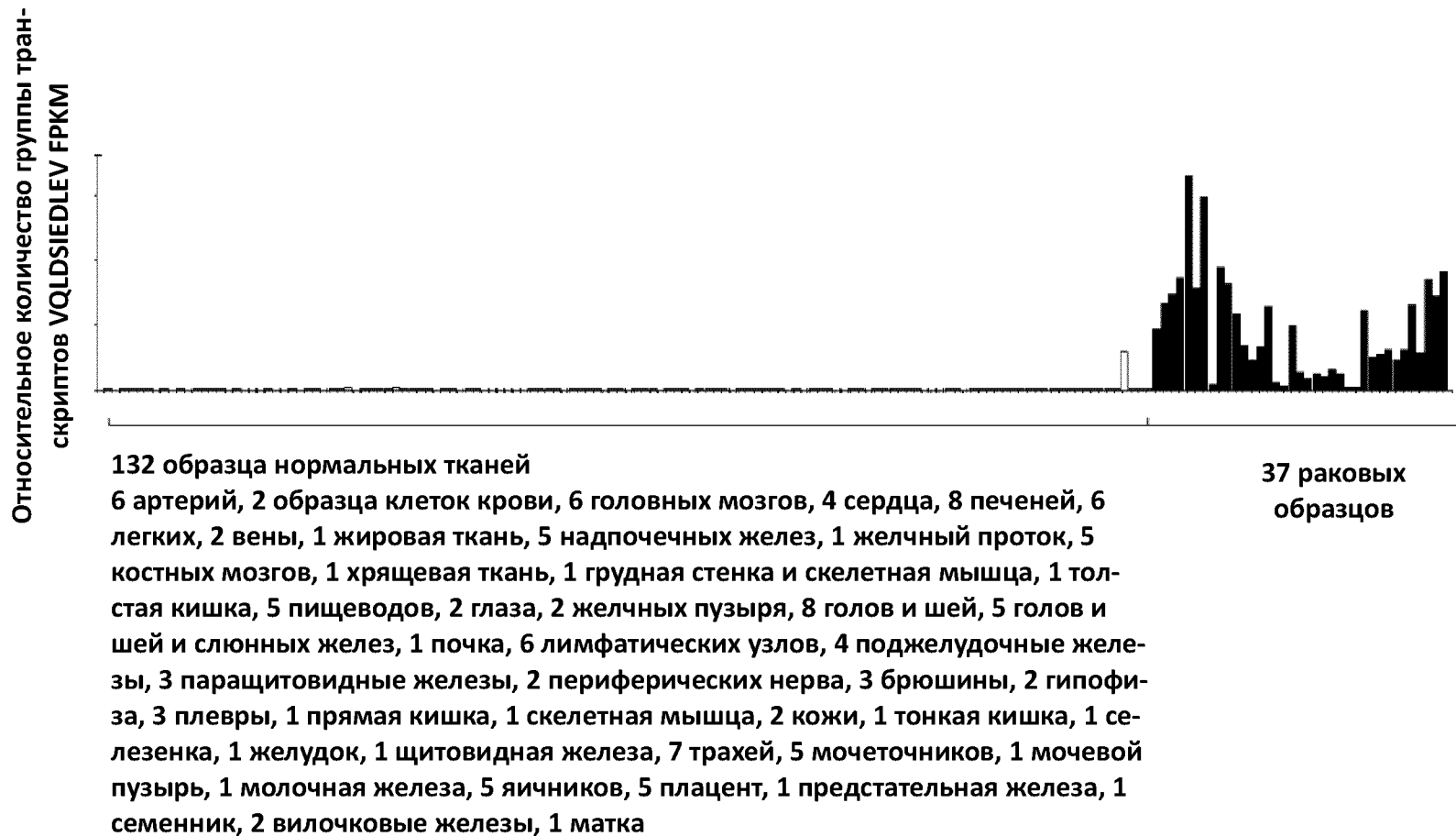
рака молочной  
железы

Фигура 2F

Ген: PRAME

Пептид: VQLDSIEDLEV

SEQ ID NO: 32

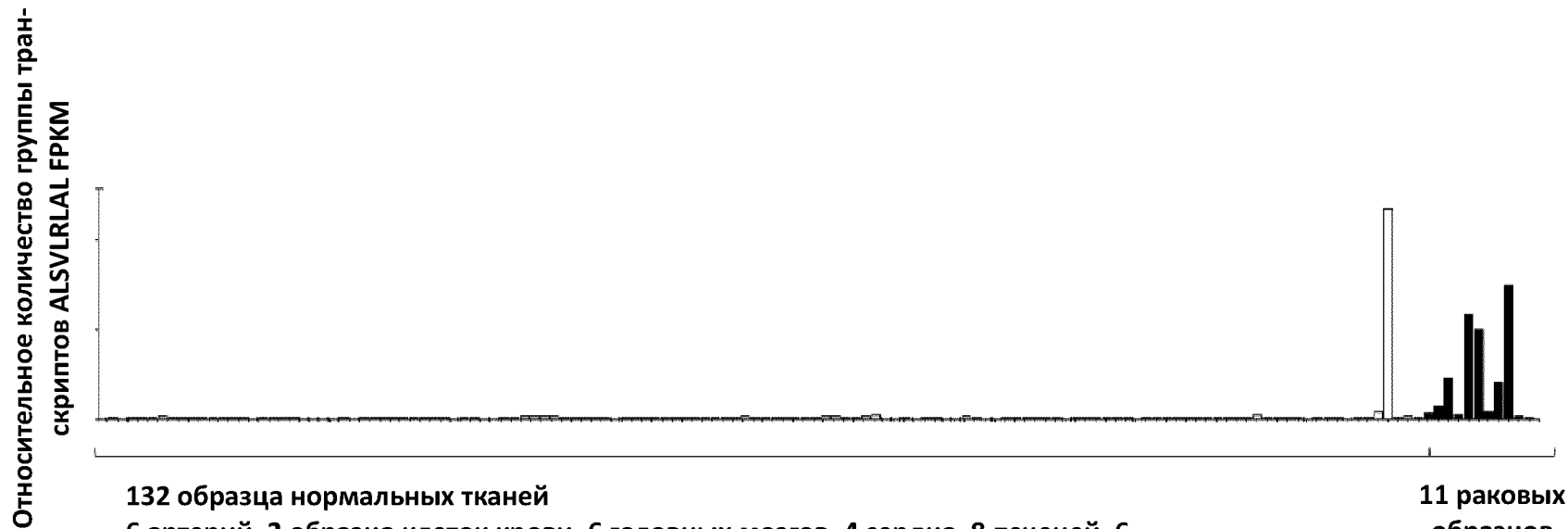


Фигура 2G

Ген: SPINK2

Пептид: ALSVLRAL

SEQ ID NO: 251



132 образцов нормальных тканей

6 артерий, 2 образца клеток крови, 6 головных мозгов, 4 сердца, 8 печеней, 6 легких, 2 вены, 1 жировая ткань, 5 надпочечных желез, 1 желчный проток, 5 костных мозгов, 1 хрящевая ткань, 1 грудная стенка и скелетная мышца, 1 толстая кишка, 5 пищеводов, 2 глаза, 2 желчных пузыря, 8 голов и шей, 5 голов и шей и слюнных желез, 1 почка, 6 лимфатических узлов, 4 поджелудочные железы, 3 паращитовидные железы, 2 периферических нерва, 3 брюшины, 2 гипофиза, 3 плевры, 1 прямая кишка, 1 скелетная мышца, 2 кожи, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 щитовидная железа, 7 трахей, 5 мочеточников, 1 мочевого пузыря, 1 молочная железа, 5 яичников, 5 плацент, 1 предстательная железа, 1 семенник, 2 вилочковые железы, 1 матка

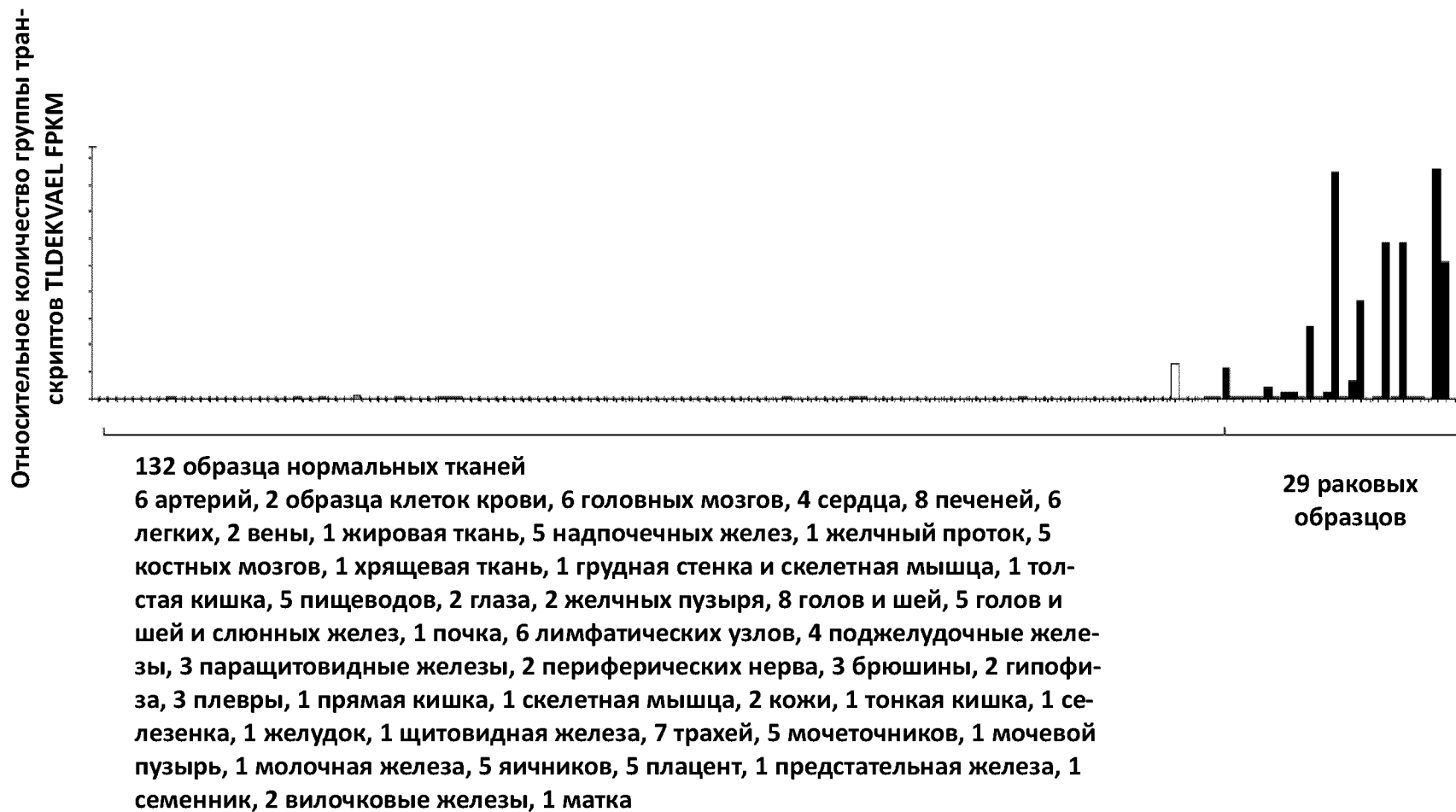
11 раковых образцов ОМЛ

Фигура 2H

Ген: MAGEC2

Пептид: TLDEKVAEL

SEQ ID NO: 24



Фигура 2I

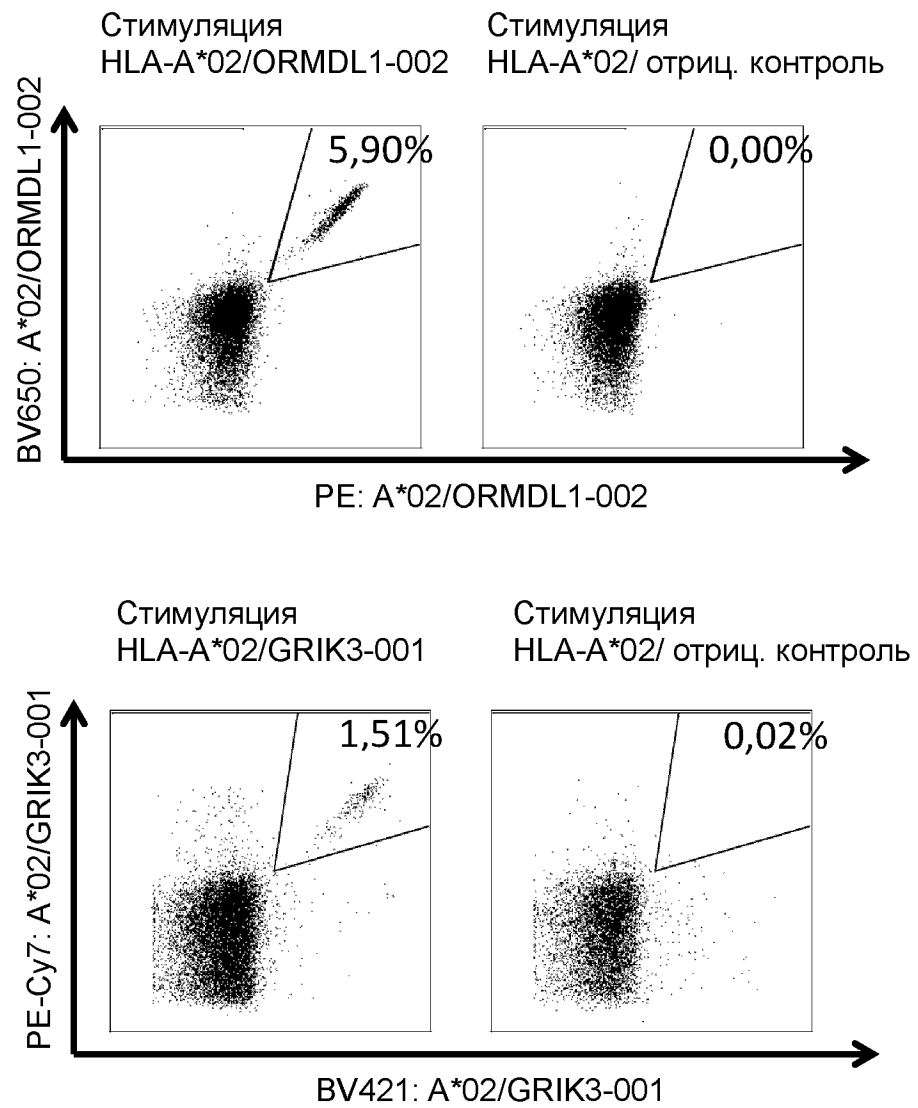
Ген: C1orf186

Пептид: FLTAINYLL

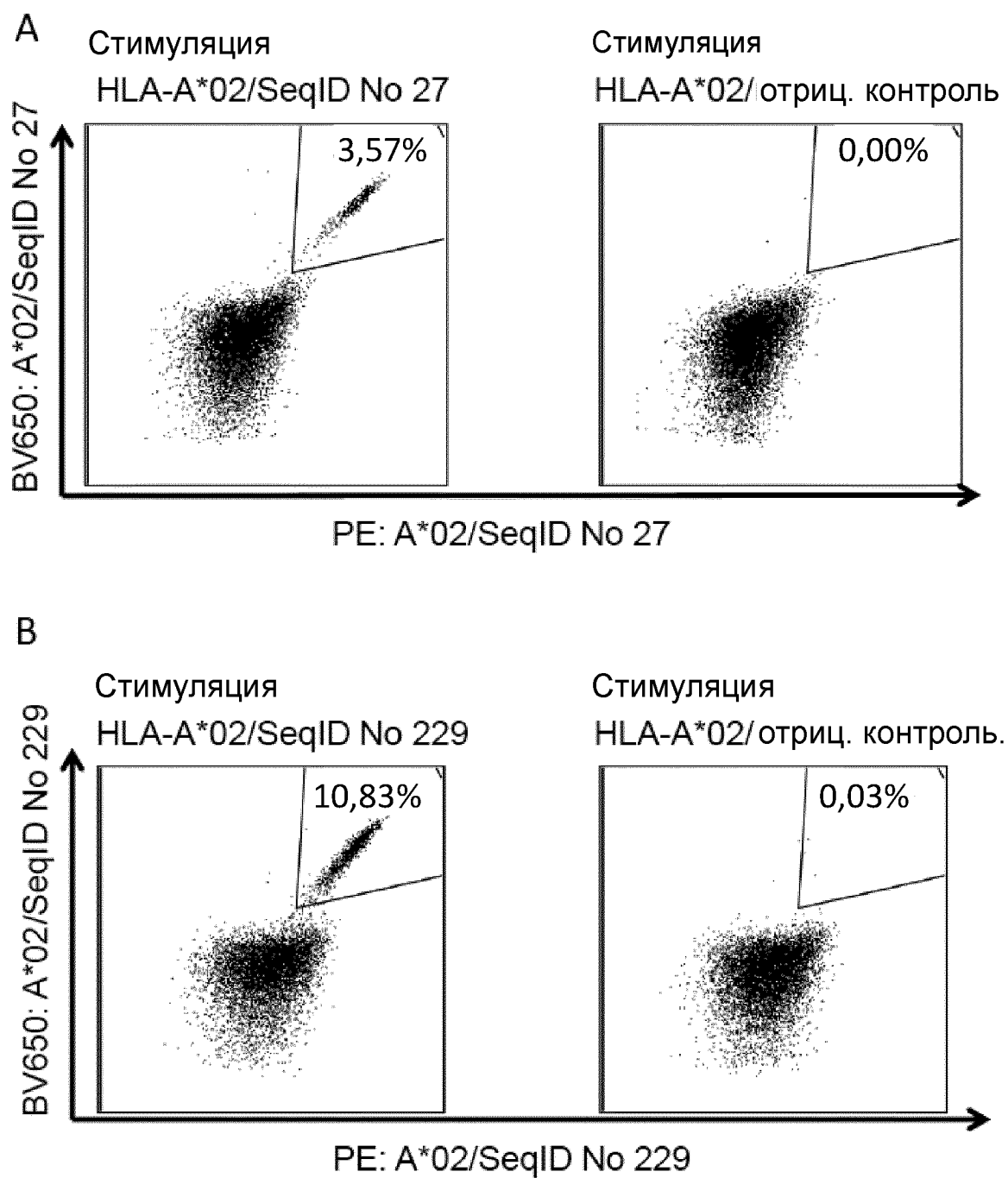
SEQ ID NO: 72



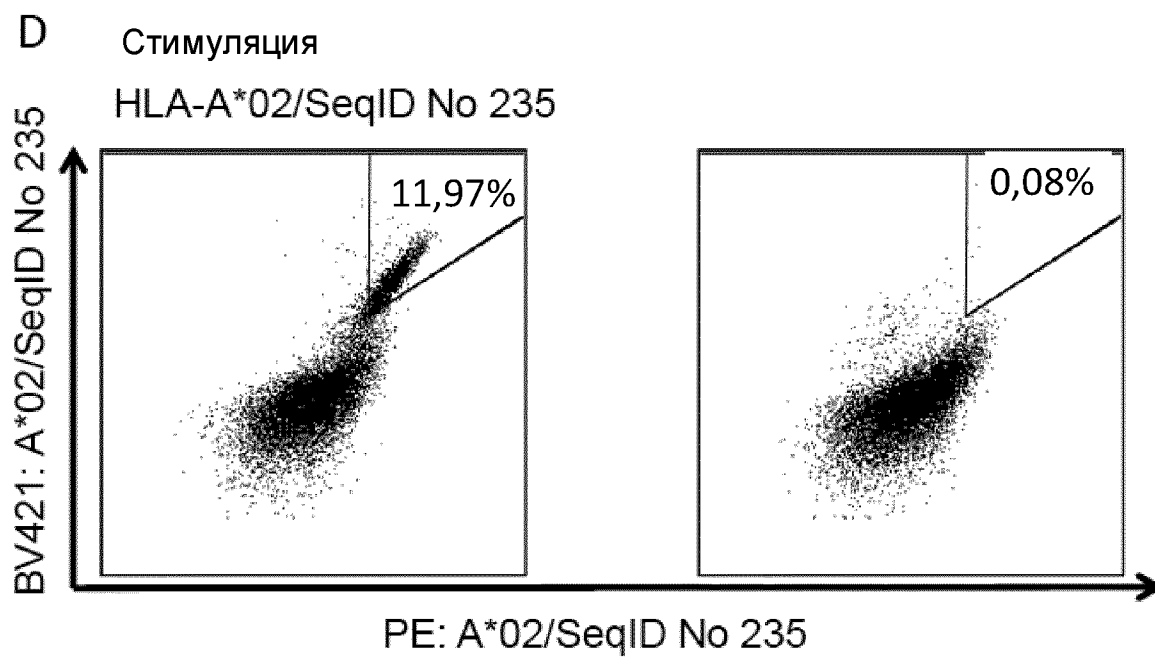
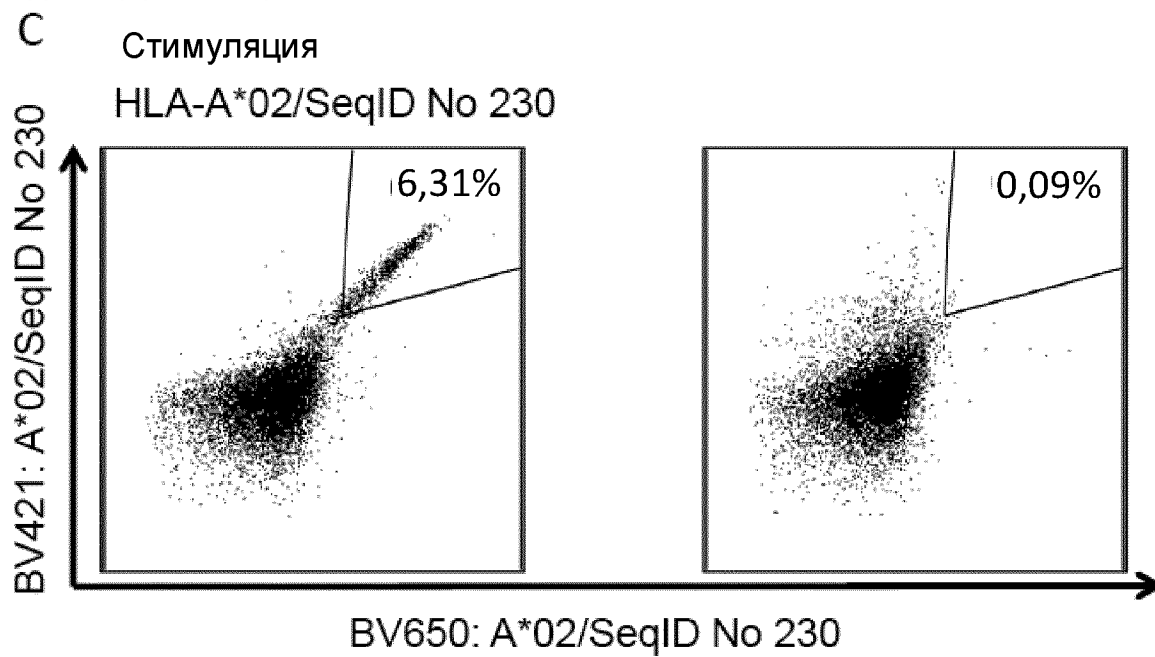
Фигура 3



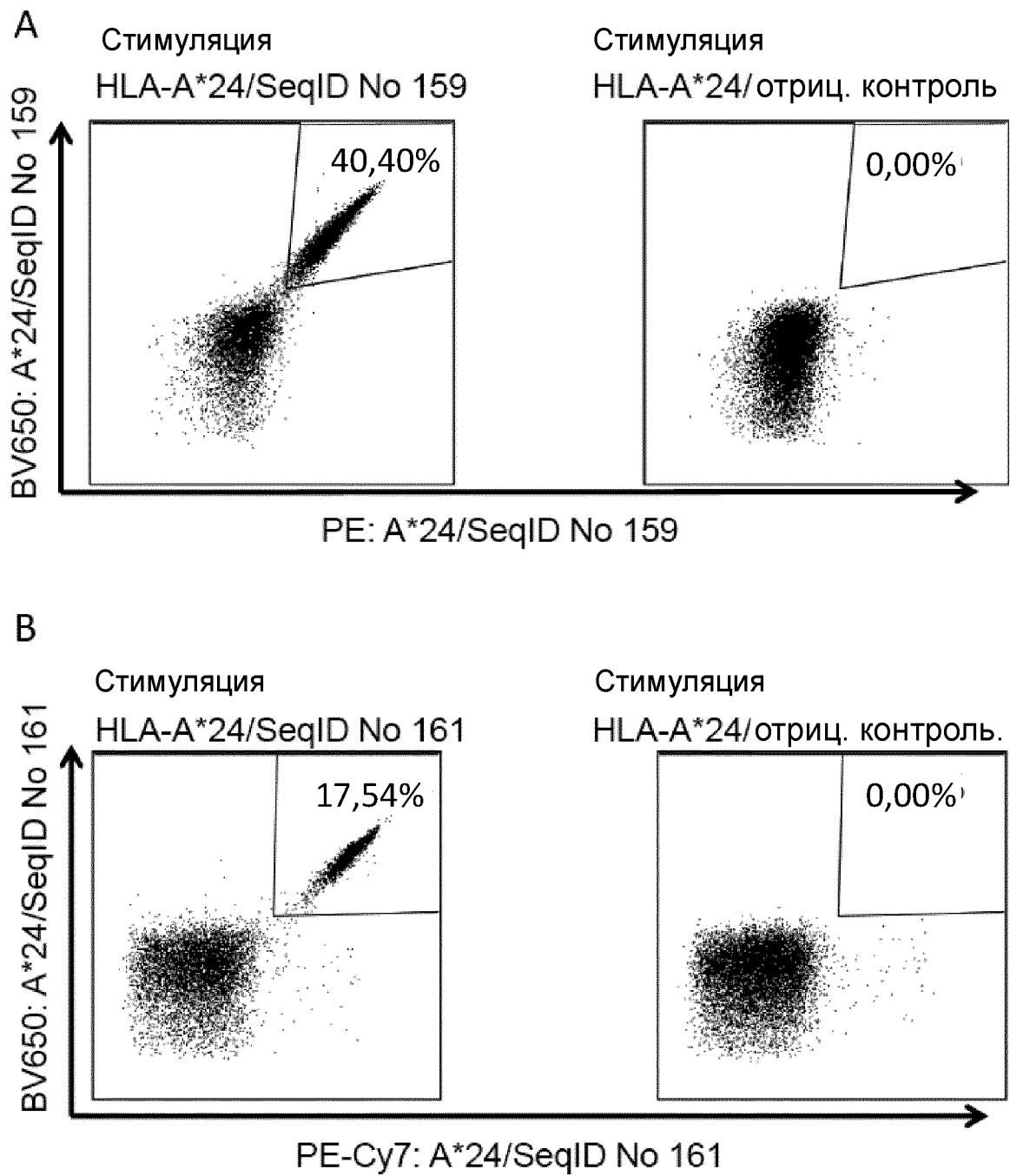
Фигура 4



Фигура 4 (продолж.)



Фигура 5



Фигура 5 (продолж.)

