

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190465** (13) **A2**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.06.30

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

(22) Дата подачи заявки
2017.02.17

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

(31) **1602918.3; 62/297,495**

(32) **2016.02.19**

(33) **GB; US**

(62) **201891638; 2017.02.17**

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

(72) Изобретатель:

**Шор Оливер, Мар Андреа, Вайншенк
Тони, Вибе Анита, Фрицше Дженс
(DE), Сингх Харприт (US)**

(74) Представитель:

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

A2

202190465

202190465

A2

Новые пептиды и комбинации пептидов для применения в иммунотерапии НХЛ и других видов рака

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

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

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Неходжкинские лимфомы (НХЛ) являются гетерогенной группой лимфопролиферативных заболеваний. НХЛ обычно образуется из лимфоидных тканей и может распространяться в другие органы (National Cancer Institute, 2015).

НХЛ является седьмым наиболее распространенным видом рака, и на его долю приходится 4,3% всех новых случаев заболевания раком в США (SEER Stat facts, 2014). Это наиболее распространенное злокачественное заболевание кроветворной системы как в Европе, так и США (Inoges et al., 2014).

Вероятность возникновения НХЛ возрастает с возрастом: Медианный возраст в момент постановки диагноза составляет 66 лет. НХЛ более распространены среди европеоидного населения (21 случай на 100 000 человек), затем среди населения африканского происхождения (15 случаев на 100 000 человек) и среди представителей монголоидной расы (14 случаев на 100 000 человек). Мужчины подвержены более высокому риску развития НХЛ, чем женщины (23,9 случая на 100 000 мужчин и 16,3 случая на 100 000 женщин) (SEER Stat facts, 2014).

Относительная 5-летняя выживаемость пациентов с НХЛ составляет 70% и варьируется в зависимости от стадии заболевания на момент постановки диагноза. В случае локализованного заболевания, относительная 5-летняя выживаемость составляет 82%. Если НХЛ распространилась на различные части тела относительная 5-летняя выживаемость падает до 73,8% в случае регионарных метастазов и до 62,4% в случае отдаленных метастазов (SEER Stat facts, 2014). Факторы риска включают (пожилой) возраст, мужской пол, этническую принадлежность (европеоидная раса), воздействие бензола или излучения, ВИЧ, аутоиммунные заболевания, инфекции HTLV-1, EBV или HHV8, инфекции *Helicobacter pylori*, *Chlamydia psittaci*, *Campylobacter jejuni* или вируса гепатита С, (высокую) массу тела и имплантаты молочной железы (American Cancer Society, 2015).

НХЛ имеет более 60 подвидов. Три наиболее распространенных подвида – это диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (ДКВЛ, наиболее распространенный подвид), фолликулярная лимфома (ФЛ, второй наиболее распространенный подвид) и мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома/хронический лимфоцитарный лейкоз (МЛЛ/ХЛЛ, третий наиболее распространенный подвид). На долю ДКВЛ, ФЛ и МЛЛ/ХЛЛ приходится около 85% случаев НХЛ (Li et al., 2015).

Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (ДКВЛ) – это наиболее распространенный вид НХЛ, охватывающий 30% всех случаев НХЛ. ДКВЛ принадлежит к агрессивному подтипу НХЛ, и у большинства пациентов

наблюдается быстрое прогрессирование заболевания. Для расчета международного прогностического индекса (МПИ) для агрессивных форм НХЛ используются пять значимых факторов риска, прогностических для общей выживаемости:

1. Возраст (≤ 60 в сравнении с > 60 лет)
2. Уровень лактатдегидрогеназы в сыворотке (ЛДГ) (нормальный в сравнении с повышенным уровнем)
3. Общее состояние (0 или 1 в сравнении с 2-4)
4. Стадия (стадия I или II в сравнении со стадиями III или IV)
5. Вовлечение экстранодального участка (0 или 1 в сравнении с 2-4).

Шансы на выживаемость без рецидивов у пациентов с двумя или более факторами риска составляют менее 50%, а общая выживаемость составляет 5 лет. Пациенты с перегруппировками генов *bcl-2* и *tms* и/или избыточной экспрессией *tms* имеют особенно неутешительный прогноз. Пациенты с ДКВЛ, совместно экспрессирующие CD20 и CD30 имеют более благоприятный прогноз, и это предопределяет проведение терапии специфическими антителами к CD30 (National Cancer Institute, 2015).

Фолликулярная лимфома (ФЛ) является вторым наиболее распространенным видом НХЛ, и на ее долю приходится 20% всех случаев НХЛ и 70% всех индолентных лимфом. У более 90% пациентов наблюдаются перегруппировки гена *bcl-2*. Возраст большинства пациентов в момент постановки диагноза составляет 50 лет или более, и заболевание имеет позднюю стадию. Для расчета международного прогностического индекса фолликулярной лимфомы (МПИФЛ) используются пять значимых факторов риска, прогностических для общей выживаемости:

1. Возраст (≤ 60 в сравнении с > 60 лет)
2. Уровень лактатдегидрогеназы в сыворотке (ЛДГ) (нормальный в сравнении с повышенным уровнем)
3. Стадия (стадия I или II в сравнении со стадиями III или IV)
4. Уровень гемоглобина (≥ 120 г/л в сравнении с < 120 г/л)
5. Число нодальных зон (≤ 4 в сравнении с > 4).

Уровень 10-летней выживаемости пациентов без факторов риска или с одним фактором риска составляет 85%. Для пациентов с тремя или более факторами

риска уровень 10-летней выживаемости составляет 40% (National Cancer Institute, 2015).

Диагноз НХЛ устанавливается на результатах исследования биоптата аномального лимфатического узла, получаемом эксцизионным методом, или биоптате пораженного органа, получаемом инцизионным методом. Кроме методов иммуногистохимии для уточнения диагноза используются методы цитогенетики, молекулярной генетики и флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) (Armitage, 2007).

Определение стадии заболевания производится после оценки истории болезни пациента, физикального обследования и лабораторных анализов, включая гематологические параметры, скрининговые биохимические исследования и, в особенности, определение уровня лактатдегидрогеназы в сыворотке (ЛДГ). Исследования с применением методов визуализации включают компьютерную томографию грудной клетки, брюшной полости и таза и ПЭТ (Armitage, 2007).

Определяющим фактором для составления прогноза и принятия решения о лечении является разграничение индолентных типов НХЛ и агрессивных НХЛ. Индолентные НХЛ прогрессируют медленно, характеризуются хорошим прогнозом и на ранних стадиях отвечают на лучевую терапию, химиотерапию и иммунотерапию, однако не поддаются лечению на поздних стадиях. Агрессивные формы НХЛ прогрессируют быстро, но чувствительны к интенсивной комбинированной химиотерапии (National Cancer Institute, 2015).

В зависимости от стадии заболевания в момент постановки диагноза пациентов подразделяют на следующие прогностические группы (National Cancer Institute, 2015):

Стадия	Прогностические группы
I	Поражение одной лимфатической зоны (область лимфатического узла, вальдейерова лимфатическое кольцо, вилочковая железа или селезенка (I)).
	Локализованное вовлечение одного экстралимфатического органа или участка без поражения лимфатических узлов (IE).

II	Поражение двух или более областей лимфатических узлов по одну сторону диафрагмы (II).
	Локализованное вовлечение одного экстралимфатического органа или участка совместно с поражением регионарных лимфатических узлов с или без поражением других лимфатических областей по ту же сторону диафрагмы (IIE). Число пораженных областей может быть указано подстрочной арабской цифрой (например, II3).
III	Поражение областей лимфатических узлов по обе стороны диафрагмы (III), которое может сочетаться с распространением в экстралимфатический орган с одновременным поражением граничащего лимфатического узла (IIIE) или с поражением селезенки (IIIS) или оба варианта (IIIE, IIIS).
IV	Диффузное или диссеминированное поражение одного или нескольких экстралимфатических органов с вовлечением лимфатических узлов или без него.
	Локализованное поражение экстралимфатического органа без вовлечения граничащих лимфатических узлов, однако в сочетании с распространением заболевания на отдаленном(ых) участке(ах). Стадия IV включает любое поражение печени или костного мозга, легких (отличное от непосредственного распространения с другого участка), или спинномозговой жидкости.

Для пациентов с НХЛ обычно используется система классификации по стадиям Анн Арбор. В этой системе стадия I, стадия II, стадия III и стадия IV дополнительно подразделяют на категории A и B. Пациентов с четко выраженными генерализованными симптомами относят к категории B, тогда как пациенты без таковых симптомов попадают в категорию A. Симптомы категории B включают необъяснимую потерю в весе, составляющую более 10%, в течение шести месяцев до постановки диагноза, необъяснимый жар с повышением температуры свыше 38°C и обильную ночную потливость. Следующие специальные обозначения используют в зависимости от поражения конкретных органов/ участков (National Cancer Institute, 2015):

Обозначение:	Конкретные участки
E	Экстранодальные злокачественные новообразования вблизи крупных лимфоидных агрегатов
N	Узлы
H	Печень
L	Легкие
M	Костный мозг
S	Селезенка
P	Плевра
O	Кости
D	Кожа

В целях установления точной стадии пациентам определяют клиническую стадию (CS) на основе сведений, полученных из клинического обследования, и стадию патологии (PS) на основе сведений, полученных из инвазивных процедур помимо первоначальной биопсии (National Cancer Institute, 2015).

Лечение НХЛ зависит от гистологического типа и стадии заболевания. Стандартные варианты лечения включают (National Cancer Institute, 2015):

Стадия	Стандартный вариант лечения
Индолентная НХЛ I стадии и II стадии с поражением смежных групп лимфатических узлов	Лучевая терапия
	Ритуксимаб ± химиотерапия
	Бдительное ожидание
	Другие виды терапии, аналогичные назначаемым для пациентов на поздних стадиях заболевания
Индолентная НХЛ II/III/IV стадии с поражением несмежных групп лимфатических узлов	Бдительное ожидание для бессимптомных пациентов
	Ритуксимаб
	Аналоги пуриннуклеозидов
	Алкилирующие вещества ± стероиды
	Комбинированная химиотерапия
	Меченный иттрием-90 ибритумомаб

	тиуксетан
	Ритуксимаб в качестве поддерживающей терапии
Индолентная рецидивирующая НХЛ	Химиотерапия (одним препаратом или их комбинацией)
	Ритуксимаб
	Леналидомид
	Моноклональные антитела к CD20, меченные радиоактивными изотопами
	Паллиативная лучевая терапия
Агрессивная НХЛ I стадии и II стадии с поражением смежных групп лимфатических узлов	R-CHOP ± (лучевая терапия пораженных участков) IF-XRT
Агрессивная НХЛ II/III/IV стадии с поражением несмежных групп лимфатических узлов	R-CHOP
	Другая комбинированная химиотерапия
Лимфобластная лимфома	Интенсивная терапия
	Лучевая терапия
Диффузная, мелкоклеточная с нерассеченными ядрами/лимфома Беркитта	Агрессивные схемы лечения несколькими препаратами
	Профилактика для центральной нервной системы (ЦНС)
Агрессивная рецидивирующая НХЛ	Трансплантация костного мозга или стволовых клеток
	Повторное лечение стандартными препаратами
	Паллиативная лучевая терапия

Индолентная НХЛ I стадии и II стадии с поражением смежных групп лимфатических узлов: Стандарт лечения включает лучевую терапию, лечение ритуксимабом (моноклональные антитела к CD20) ± химиотерапию, тактику

бдительного ожидания и другие методы терапии, аналогичные предписываемым для пациентов на поздних стадиях заболевания.

Индолентная НХЛ II/III/IV стадии с поражением несмежных групп лимфатических узлов: Стандарт лечения включает тактику бдительного ожидания для бессимптомных пациентов, лечение ритуксимабом, обинутузумабом (моноклональные антитела к CD20), аналогами пуриннуклеозидов (флударабин, 2-хлордезоксиаденозин), алкилирующими веществами (циклофосфамид, хлорамбуцил) ± стероидами, бендамустином, комбинированную химиотерапию (CVP, С-MOPP (циклофосфамид, винкристин, прокарбазин и преднизон), CHOP, FND (флударабин, митоксантрон ± дексаметазон)), меченный иттрием ибритумомаб тиуксетан и ритуксимаб в качестве поддерживающей терапии. Ритуксимаб (R) рассматривается как терапия первой линии, как в отдельности, так и в комбинации с другими препаратами (R-бендамустин, R-F (флударабин), R-CVP (циклофосфамид, винкристин и преднизон), R-CHOP (циклофосфамид, доксорубицин, винкристин и преднизон), R-FM (флударабин, митоксантрон), R-FCM (флударабин, циклофосфамид и митоксантрон)). Клиническую оценку проходят трансплантация костного мозга (BMT) или трансплантация периферических стволовых клеток (PSCT), идиотипические вакцины и моноклональные антитела, меченные радиоактивными изотопами (офатумумаб: моноклональные антитела к CD20).

Индолентная рецидивирующая НХЛ: Стандарт лечения включает химиотерапию (одним препаратом или их комбинацией), лечение ритуксимабом, леналидомидом, моноклональными антителами к CD20, мечеными радиоактивными изотопами (меченный иттрием-90 ибритумомаб) и паллиативную лучевую терапию. Клиническую оценку проходит трансплантация стволовых клеток (SCT).

Агрессивная НХЛ I стадии и II стадии с поражением смежных групп лимфатических узлов: Стандарт лечения включает R-CHOP ± IF-XRT. Варианты лечения, находящиеся на стадии клинической оценки, включают R-ACVBP

(ритуксимаб + доксорубицин, циклофосфамид, виндезин, блеомицин, преднизон).

Агрессивная НХЛ II/III/IV стадии с поражением несмежных групп лимфатических узлов: Стандарт лечения включает комбинированную химиотерапию ± локальную лучевую терапию. Комбинации лекарственных препаратов включают ACVBP, CHOP, CNOP (циклофосфамид, митоксантрон, винкристин, преднизон), m-BACOD (метотрексат, блеомицин, доксорубицин, циклофосфамид, винкристин, дексаметазон, лейковорин), MACOP-B (метотрексат, доксорубицин, циклофосфамид, винкристин, преднизон с фиксированной дозировкой, блеомицин, лейковорин), ProMACE CytaBOM (преднизон, доксорубицин, циклофосфамид, этопозид, цитарабин, блеомицин, винкристин, метотрексат, лейковорин), R-CHOP. Клиническую оценку проходят BMT и SCT.

Лимфобластная лимфома: Стандарт лечения включает интенсивную терапию и лучевую терапию.

Диффузная, мелкоклеточная с нерассеченными ядрами/ лимфома Беркитта: Стандарт лечения включает агрессивные схемы лечения несколькими препаратами и профилактику ЦНС.

Агрессивная рецидивирующая НХЛ: Стандарт лечения включает BMT или SCT, повторную терапию стандартными препаратами (ритуксимаб, моноклональные антитела к CD20, меченные радиоактивными изотопами, денилейкин-дифтитокс (химерный белок, включающий участки ИЛ-2 и дифтерийного токсина)) и паллиативную лучевую терапию. Варианты лечения, находящиеся на стадии клинической оценки, включают SCT (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 IFN-альфа, 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. Вакцины состоят 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 интратуморальным CpG в комбинации с химиотерапией или облученными опухолевыми клетками, выращенными в присутствии ГМ-КСФ, и сбор/ экспансию/ повторное введение Т-клеток.

В схемы вакцинации 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).

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 НХЛ в частности. Также существует необходимость идентифицировать факторы, представляющие собой биомаркеры рака в целом и НХЛ в частности, что позволит лучше ставить диагноз, составлять прогноз и предсказывать успех лечения.

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

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

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

б) Антигены дифференциации: Данные ТАА встречаются в опухолевых и нормальных тканях, из которых образуется опухоль. Большинство из известных антигенов дифференциации обнаружено в меланомах и нормальных

меланоцитах. Многие из этих линиеспецифических белков меланоцитов участвуют в биосинтезе меланина и поэтому не являются опухолеспецифическими, однако, несмотря на это, они широко применяются в противораковой терапии. Примеры включают, но не ограничиваются, тирозиназой и Melan-A/MART-1 для меланомы или ПСА для рака предстательной железы.

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

г) Опухолеспецифические антигены: данные уникальные ТАА образуются в результате мутаций нормальных генов (таких как β -катенин, CDK4 и т. д.). Некоторые из этих молекулярных изменений ассоциированы с неопластической трансформацией и/или прогрессией. Опухолеспецифические антигены, в основном, способны индуцировать сильные иммунные ответы, не заключая в себе риска аутоиммунных реакций по отношению к нормальным тканям. С другой стороны, данные ТАА в большинстве случаев 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) (MHC). Антигены, которые распознаются опухолеспецифическими Т-лимфоцитами, то есть их эпитопами, могут быть молекулами, образованными из любого класса белков, таких как ферменты, рецепторы, факторы транскрипции и т. д., которые экспрессируются и, по сравнению с не измененными клетками того же происхождения, обычно имеют повышенный уровень в клетках соответствующей опухоли.

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

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

преимущественно на профессиональных антигенпрезентирующих клетках (АПК) и, в первую очередь, презентировать пептиды экзогенных или трансмембранных белков, которые поглощаются АПК, например, во время эндоцитоза и впоследствии процессируются. Комплексы пептида и молекул МНС I класса распознаются CD8-положительными Т-клетками, несущими подходящий Т-клеточный рецептор (ТКР), тогда как комплексы пептида и молекул МНС II класса распознаются CD4-положительными хелперными Т-клетками, несущими подходящий ТКР. Хорошо известно, что ТКР, пептид и МНС встречаются в стехиометрическом соотношении 1:1:1.

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

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

Удлиненные (более длинные) пептиды по изобретению могут 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 опухолеассоциированный пептид / МНС на их клеточной поверхности. Таким образом, опухолеассоциированные пептидные эпитопы Т-хелперных клеток, одни или в комбинации с другими опухолеассоциированными пептидами, могут служить в качестве активных фармацевтических ингредиентов вакцинных композиций, которые стимулируют противоопухолевые иммунные ответы.

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

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

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

Для того чтобы пептид МНС I класса инициировал (вызывал) клеточный иммунный ответ, он также должен связываться с молекулой МНС. Этот процесс зависит от аллеля молекулы МНС и специфических полиморфизмов аминокислотной последовательности пептида. Пептиды, связывающиеся с

МНС I класса, как правило, имеют 8-12 аминокислотных остатков в длину и обычно содержат два консервативных остатка («якори») в их последовательности, которые взаимодействуют с соответствующей связывающей бороздкой молекулы МНС. Таким образом, каждый аллель МНС имеет «связывающий мотив», определяющий, какие пептиды могут специфически связываться со связывающей бороздкой.

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

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

(«иммуногенный пептид»), образованный из опухолеассоциированного антигена, ведет к Т-клеточному ответу *in vitro* или *in vivo*.

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

Поэтому антигены ТАА являются отправной точкой для разработки терапии на основе Т-клеток, включающей противоопухолевые вакцины, но не ограничивающейся ими. Методы идентификации и определения характеристики ТАА обычно основаны на использовании Т-клеток, которые могут быть выделены из организма пациентов или здоровых субъектов, или же они могут быть основаны на генерировании различающихся транскрипционных профилей или различающихся паттернов экспрессии пептидов между опухолевыми и нормальными тканями. Однако идентификация генов, избыточно экспрессированных в опухолевых тканях или человеческих опухолевых клеточных линиях или же селективно экспрессированных в таких тканях или клеточных линиях, не дает точной информации об использовании антигенов, транскрибированных с данных генов, в иммунотерапии. Это обусловлено тем, что только отдельная субпопуляция эпитопов этих антигенов подходит для такого применения, так как Т-клетка с соответствующим ТКР должна быть в наличии, и необходимо, чтобы отсутствовала или была минимальной иммунологическая толерантность к этому конкретному эпитопу. Поэтому в наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения важно выбрать только те пептиды, презентруемые в избытке или селективно, против которых может быть обнаружена функциональная и/или пролиферирующая Т-клетка. Такая функциональная Т-клетка определяется как Т-клетка, которая при стимуляции специфическим антигеном может быть распространена посредством клонирования и способна к выполнению эффекторных функций («эффекторная Т-клетка»).

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

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В первом аспекте настоящее изобретение относится к пептиду, включающему аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 311, 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: 311, где указанный вариант связывается с МНС и/или индуцирует Т-клеточную перекрестную реакцию с указанным пептидом, или его фармацевтически приемлемой соли, где указанный пептид не является базовым полипептидом полной длины.

Настоящее изобретение относится далее к пептиду по настоящему изобретению, включающему последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO 311, 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 311, где указанный пептид или его вариант обладает общей длиной, составляющей 8–100, предпочтительно 8–30 и, наиболее предпочтительно, 8–14 аминокислот.

В последующих таблицах представлены пептиды в соответствии с настоящим изобретением, соответствующие им SEQ ID NO и потенциальные исходные (лежащие в основе) гены для данных пептидов. Все пептиды Таблицы 1 и Таблицы 2 связываются с HLA-A*02. Пептиды из Таблицы 2 были раскрыты ранее в виде обширных списков в качестве результатов скринингов с высокой пропускной способностью с высокой долей ошибок или были вычислены с

помощью алгоритмов, однако ранее ни в коей мере не были ассоциированы с раковыми заболеваниями. Пептиды из Таблицы 3 являются дополнительными пептидами, которые могут быть полезны в комбинации с другими пептидами по изобретению. Пептиды Таблиц 4А и 4Б полезны также для диагностики и/или лечения различных других злокачественных заболеваний, которые включают избыточную экспрессию или избыточную презентацию соответствующего базового полипептида.

Таблица 1: Пептиды в соответствии с настоящим изобретением.

SEQ ID No.	Последовательность	Идент. номер(а) гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
1	LLSGQLPTI	84969	TOX2
2	LLSEETPSA	10765	KDM5B
3	LTIDTQYYL	5422	POLA1
4	TLLGFFLAKV	5422	POLA1
5	VLQGLTFTL	6890	TAP1
6	TLITLPLLFL	6890	TAP1
7	NLLGMIFSM	51398	WDR83OS
8	ALYAVIEKA	5293	PIK3CD
9	FLLDLDPPL	7915	ALDH5A1
10	FLLVGTQIDL	643751,998	CDC42P6, CDC42
11	GLDVTVALL	23203	PMPCA
12	GLLLLVPPL	145864	HAPLN3
13	HLVPASWKL	3718	JAK3
14	LLSDPTPGA	3718	JAK3
15	IIIEDLLEA	10985	GCN1L1
16	TLIAAILYL	5355	PLP2
17	VIIPLLSSV	91526	ANKRD44
18	KLTDQPPLV	91526	ANKRD44
19	VLEAILPLV	2889	RAPGEF1
20	YLIAGGDRWL	2646	GCKR
21	ALFKEAYSL	55732	C1orf112
22	ALKKHLTSV	10773	ZBTB6
23	ALVEDIINL	92399	MRRF
24	AVLGFSFRL	80222	TARS2
25	FLDTSNQHLL	4064	CD180
26	FLGSFIDHV	91147	TMEM67
27	FLNQESFDL	6610	SMPD2
28	FLSNANPSL	7818	DAP3
29	ILSDVTQGL	55591	VEZT
30	ILSTLDVEL	10744,9232	PTTG2, PTTG1
31	KLYDEESLL	57680	CHD8
32	VLNEDELPSV	57680	CHD8

33	LLANIVPIAMLV	4539,6775071, 8923201	MT-ND4L
34	LLWEDGVTEA	22916	NCBP2
35	SLSSERYYL	8320	EOMES
36	VILDIPLLFT	79877	DCAKD
37	VLGNALEGV	4678	NASP
38	YLTAEILELAGN	221613,3012,3 013,3014,3177 72,55766,7237 90,8329,8330, 8331,8332,833 4,8335,8336,8 337,8338,8523 5,8969,92815, 9555	HIST1H2AA, HIST1H2AE, HIST1H2AD, H2AFX, HIST2H2AB, H2AFJ, HIST2H2AA4, HIST1H2AI, HIST1H2AK, HIST1H2AJ, HIST1H2AL, HIST1H2AC, HIST1H2AB, HIST1H2AM, HIST2H2AA3, HIST2H2AC, HIST1H2AH, HIST1H2AG, HIST3H2A, H2AFY
39	QLLPQGIVPAL	55374	TMC06
40	FLNSVIVDL	6249	CLIP1
41	ILASIFETV	6574	SLC20A1
42	YLQDLVERA	10347	ABCA7
43	ALLEGVKNV	84678	KDM2B
44	FIIEEQSFL	10200	MPHOSPH6
45	FILDDSAFL	23130	ATG2A
46	FLVEEIFQT	8888	MCM3AP
47	GLLPKLTAL	22920	KIFAP3
48	KILDEDLYI	641	BLM
49	TILGDPQILL	23460	ABCA6
50	LLLDGLIYL	23460	ABCA6
51	SLLGNPVL	23460	ABCA6
52	VLLDVDAAFL	617	BCS1L
53	FLREYFERL	5573	PRKAR1A
54	DIFDAMFSV	5573	PRKAR1A
55	ILVEVDLVQA	4261	CIITA
56	GLQDLLFSL	4261	CIITA
57	LQIGDFVSV	51167	CYB5R4
58	QLAPFLPQL	23392	KIAA0368
59	RLHREVAQV	2802	GOLGA3
60	SLLIDVITV	51534	VTA1
61	SLLNKDLSL	1786	DNMT1
62	ALAPYLDLL	54093	SETD4
63	ALIEEAYGL	3836,3841	KPNA1, KPNA5
64	FLVEVSNDV	23224	SYNE2
65	NLTDVSPDL	23224	SYNE2
66	KLAPIPVEL	153241	CEP120
67	LLATVNVAL	23511	NUP188
68	QIAAFLFTV	56006	SMG9

69	TLLAFPLLL	84720	PIGO
70	VLIEILQKA	23633,3841	KPNA6, KPNA5
71	VLLDYVGNVQL	51676	ASB2
72	TLQEETAVYL	51676	ASB2
73	YLGEEYPEV	23451	SF3B1
74	SLDLRPLEV	43	ACHE
75	AALKYIPSV	1794	DOCK2
76	ALADLVPVDVVV	84188	FAR1
77	ALLDVSNNYGI	115752	DIS3L
78	AMEEAVAQV	22897	CEP164
79	AMKEEKEQL	9126	SMC3
80	YLFDEIDQA	9126	SMC3
81	FIFSYITAV	128338	DRAM2
82	FLIDGSSSV	1690	COCH
83	FLMDDNMSNTL	4603	MYBL1
84	FLQELQLEHA	8604	SLC25A12
85	GLAPAEVVVATVA	57591	MKL1
86	GLATIRAYL	2731	GLDC
87	GLFARIIMI	5250	SLC25A3
88	GLFDNRSGLPEA	79733	E2F8
89	GLTALHVAV	602	BCL3
90	HLDEVFLEL	55744	COA1
91	HLSSTTAQV	201633	TIGIT
92	KLLFEIASA	124460	SNX20
93	KLLGSLQLL	81603	TRIM8
94	LLAGQATTAYF	972	CD74
95	LLFDLIPVVS	284114	TMEM102
96	LLLNENESLFL	26156	RSL1D1
97	LLNFSPGNL	3929	LBP
98	MLQDGIARL	79697	C14orf169
99	QLYDGATALFL	147463	ANKRD29
100	RLIRTIAAI	140461	ASB8
101	SLDQSTWNV	23240	KIAA0922
102	SLFAAISGMIL	931	MS4A1
103	SLQDHLEKV	1756	DMD
104	VLLGLPLLV	9674	KIAA0040
105	VLTPVILQV	100499483,10 0499484	C9orf174
106	VLVYELLQYI	51513	ETV7
107	VQAVSIPEV	55755	CDK5RAP2
108	YLAPENGYLM	6625	SNRNP70
109	YLFQFSAAL	130367	SGPP2
110	YQYPFVLGL	130367	SGPP2
111	YLLDTLLSL	57448	BIRC6
112	FLAILPEEV	7762	ZNF215
113	FVIDSFEEL	147945	NLRP4

114	GLSDISPST	26005	C2CD3
115	LLIDIIHFL	25914	RTTN
116	SLLDNLLTI	25914	RTTN
117	VLATILAQL	26271	FBXO5
118	VLDGMIYAI	54813	KLHL28
119	ELCDIILRV	54813	KLHL28
120	VLLGTTWAL	221188	GPR114
121	YLTGYNFTL	9521	EEF1E1
122	AISEAQESV	79882	ZC3H14
123	ALLSAFVQL	8295	TRRAP
124	FLGVVPTV	56996	SLC12A9
125	FVAPPTAAV	162	AP1B1
126	GLSIFIYRL	10075	HUWE1
127	HLMEENMIVYV	65220	NADK
128	KLFDASPTFFA	3992,3995	FADS1, FADS3
129	SLFEASQQL	23347	SMCHD1
130	VIFSYYVLGV	79004	CUEDC2
131	VLIEETDQL	6924	TCEB3
132	VLQDQVDEL	51199	NIN
133	ALEELTGFREL	4288	MKI67
134	ALGRLGILSV	22828,26230	SCAF8, TIAM2
135	ALTGLQFQL	22797	TFEC
136	FIFGIVHLL	64066	MMP27
137	FIQQERFFL	4012	LNPEP
138	NLINNIFEL	4012	LNPEP
139	FLASPLVAI	3593	IL12B
140	FLFEDFVEV	140775	SMCR8
141	FLGELTLQL	257218	SHPRH
142	FLYEDSKSVRL	696	BTN1A1
143	TLHAVDVTL	696	BTN1A1
144	GLITQVDKL	9183	ZW10
145	GLLHEVVSL	163486	DENND1B
146	GLLQQPPAL	1871	E2F3
147	GLSEYQRNFL	56890	MDM1
148	ICAGHVPGV	79019	CENPM
149	ILNPVTTKL	81691	LOC81691
150	ILSEKEYKL	127254	C1orf173
151	ILVKQSPML	940	CD28
152	KIMYTLVSV	3709	ITPR2
153	KLLKGIYAI	1235	CCR6
154	KLMNIQQQL	11214	AKAP13
155	KLMTSLVKV	10734	STAG3
156	KMLEDDLKL	2334	AFF2
157	KVLEFLAKV	139422,4113,4115	MAGEB10, MAGEB2, MAGEB4
158	KVQDVLHQV	83756	TAS1R3

159	LLLSDSGFYL	28557	TRBV30
160	LLPPPSPA	83881	MIXL1
161	NLMLELET	1063	CENPF
162	RLADLKVSI	2175	FANCA
163	SIFDAVLKGV	157680	VPS13B
164	SLFDGAVISTV	23049	SMG1
165	KLLEEIEFL	23049	SMG1
166	SLFSEVASL	22832	KIAA1009
167	SLFSITKSV	60468	BACH2
168	SLLSPLLSV	54949	SDHAF2
169	SSLEENLLHQV	80205	CHD9
170	STIELSENSL	55635	DEPDC1
171	TLLDVISAL	27340	UTP20
172	TLQDSLEFI	51735,96459	RAPGEF6, FNIP1
173	VILDSVASV	5890	RAD51B
174	VLVEITDVDFAA	79801	SHCBP1
175	VMESILLRL	342850	ANKRD62
176	YLHIYESQL	29851	ICOS
177	YLYEAEETTL	22798	LAMB4
178	YVLQGEFFL	84541	KBTBD8
179	FVDTNLYFL	81037	CLPTM1L
180	GILQLVESV	6050	RNH1
181	LLFDQNDKV	100653071,10491	CRTAP
182	LLPPPPVA	23091,4784	ZC3H13, NFIX
183	VLFTVLT	8906	AP1G2
184	AVLGTSWQL	23041	MON2
185	FIAQLNNVEL	6509	SLC1A4
186	FLDVSRDFV	54461	FBXW5
187	FLNSFVFKM	89910	UBE3B
188	GLEDEMYEV	285905,644619,92105	INTS4L1, INTS4L2, INTS4
189	SLSHLVPAL	285905,644619,92105	INTS4L1, INTS4L2, INTS4
190	GLIELVDQL	90410	IFT20
191	GLSDISAQV	5989	RFX1
192	GMAAEVVKV	348378	FAM159A
193	SLADSMPSL	8945	BTRC
194	SLAPFDREPFTL	3937	LCP2
195	ALIPDLNQI	51361	HOOK1
196	TLALAMIYL	100134301,285074,64682,730268	ANAPC1
197	YLLTDNVVKL	79810	PTCD2
198	GLLSAVSSV	9894	TELO2
199	SLNSTTWKV	1233	CCR4

200	YLLDFEDRL	23207	PLEKHM2
201	YLNISQVNV	9262	STK17B
202	ALAAGGYDV	3009	HIST1H1B
203	ILDTIFHKV	2829	XCR1
204	RLCDIVNV	84614	ZBTB37
205	TLFYESPHL	221908	PPP1R35
206	SAVSGQWEV	2326	FMO1
207	GLVGLLEQA	57572,81704,85440	DOCK6, DOCK8, DOCK7
208	FLAVSLPLL	3071	NCKAP1L
209	FLLDTISGL	84864	MINA
210	FLAEQFEFL	55610	CCDC132
211	FIDDLFAFV	1209	CLPTM1
212	FLIGQGAHV	4659	PPP1R12A
213	YINEDEYEV	7874	USP7
214	FLFDGMSL	3683	ITGAL
215	QLFEEEEIEL	63906	GPATCH3
216	KVVSNLPAI	10199	MPHOSPH10
217	AQFGAVLEV	55131	RBM28
218	ALDQFLEGI	57169	ZNFX1
219	ALLELENSV	715,83481	C1R, EPPK1
220	FLAEAPTAL	9814	SFI1
221	FLAPDNSLLLA	22898	DENND3
222	FLIETGTLL	79705	LRRK1
223	FLQDIPDGLFL	206426,266971,8394	PIP5K1P1, PIPSL, PIP5K1A
224	FLSPLLPLL	10961	ERP29
225	GTYQDVGSLNIGDV	973	CD79A
226	GVIDPVPEV	8879	SGPL1
227	IIAEGIP EA	47	ACLY
228	IIAEYLSYV	51667	NUB1
229	ILSPWGAEV	142	PARP1
230	IMDDDSYGV	9874	TLK1
231	IVMGAIPSV	1902	LPAR1
232	KVMEGTVAA	1445	CSK
233	MLEVHIPSV	79856	SNX22
234	NLQRTVTV	4297	MLL
235	SLDVYELFL	79586	CHPF
236	SLFDGFFLTA	25920	COBRA1
237	YLDRLIPQA	115209	OMA1
238	YQYGAVVTL	1380	CR2
239	VLIDDTVLL	116138	KLHDC3
240	ALVPTPALFYL	51528	JKAMP
241	FIPDFIPAV	56912	IFT46

242	GILDFZVFL	100124692,89 72,93432	MGAM
243	GLPDLDIYL	23334	SZT2
244	ILEPFLPAV	6894	TARBP1
245	KLIQLPVVYV	9875	URB1
246	KLPVPLESV	285190,40096 6,5903,653489 ,727851,72954 0,729857,8422 0	RGPD4, RGPD1, RANBP2, RGPD3, RGPD8, RGPD6, RGPD2, RGPD5
247	KVLEMETTV	9810	RNF40
248	NLLEQFILL	64708	COPS7B
249	VLLESLVEI	149371	EXOC8
250	VLTNVGAAL	129285	PPP1R21
251	VLVELFTYI	3717	JAK2
252	YLGDLIMAL	3930,7108	LBR, TM7SF2

Таблица 2: Дополнительные пептиды 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
253	YSDDDVPSV	29028	ATAD2
254	FLYSETWNI	4519,8923205	MT-CYB
255	GMWNP NAPVFL	9910	RABGAP1L
256	ALQETPPQV	146206	RLTPR
257	FLQEWEVYA	57001	ACN9
258	RIYPFLLMV	10299	MARCH6
259	TVLDGLEFKV	10592	SMC2
260	RLDEAFDFV	1844	DUSP2
261	FLPETRIMTSV	11319	ECD
262	LMGPVVHEV	5116	PCNT
263	GLMDNEIKV	8795	TNFRSF10B
264	ILTGTPPGV	151313,51011	FAHD2B, FAHD2A
265	ILWHFVASL	23077	MYCBP2
266	QLTEMLPSI	689	BTF3
267	SLLETGSDLLL	57176	VAR2
268	VLFPPLPTPL	11184	MAP4K1
269	VLQNVAFSV	597	BCL2A1
270	VVVDSDSLAFV	122961	ISCA2
271	YLLDQPVLEQRL	81887	LAS1L
272	KLDHTLSQI	4863	NPAT
273	AILLPQPPK	1761,6392,641 47,642204,654 434,84286,853 63	DMRT1, SDHD, KIF9, LINC00338, TMEM175, TRIM5
274	KLLNLISKL	5366	PMAIP1
275	KLMDLEDAL	23269	MGA

SEQ ID No.	Последовательность	Идент. номер(а) гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
276	NMISYVVHL	204801	NLRP11
277	FLIDLNSTHGTFL	5511	PPP1R8
278	FLLFINHRL	4292	MLH1
279	NLAGENILNPL	56948	SDR39U1
280	SLLNHLPYL	201562	PTPLB
281	TLQTVPLTTV	1997	ELF1
282	YLLEQGAQV	55527	FEM1A
283	ALMPVTPQA	23683	PRKD3
284	KLQEQIHRV	196441	ZFC3H1
285	SITAVTPLL	63910	SLC17A9
286	HLTEDTPKV	50814	NSDHL
287	ILMGHSLYM	9786	KIAA0586
288	RLAPEIVSA	157285	SGK223
289	SLLAANNLL	9380	GRHPR
290	IASPVIAAV	127544	RNF19B
291	KIIDTAGLSEA	22954	TRIM32
292	KLINSQISL	5293	PIK3CD
293	GLAMVEAISYV	109	ADCY3
294	KLYGPEGLELV	3394	IRF8
295	SLAAVSQQL	7094	TLN1
296	FILEPLYKI	9343	EFTUD2
297	ILQNGLETL	89857	KLHL6
298	ALTDVILCV	89857	KLHL6
299	RLLEEEGVSL	64428	NARFL
300	IVLERNPEL	5257	PHKB
301	LQFDGIHVV	55294	FBXW7
302	SLAELDEKISA	51562	MBIP
303	FVWEASHYL	5442	POLRMT
304	ALIRLDDLFL	56902	PNO1
305	AMLAQQMQL	4154	MBNL1
306	AQVALVNEV	10075	HUWE1
307	FLLPVAVKL	3954	LETM1
308	SLLDQIPEM	9632	SEC24C
309	SLSFVSPSL	11108	PRDM4
310	VMAEAPPGV	9798	IST1
311	YLHRQVAHV	6890	TAP1

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

SEQ ID No.	Последовательность	Идент. номер(а) гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
312	RLPDIPLRQV	55656	INTS8
313	ALSVRISNV	3766	KCNJ10
314	LIDDKGTIKL	983	CDK1

SEQ ID No.	Последовательность	Идент. номер(а) гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
315	SLYDSIAFI	56978	PRDM8
316	SLSAFLPSL	54757	FAM20A
317	GLSNLGIKSI	122553	TRAPPC6B
318	KIQEMQHFL	4321	MMP12
319	SLYKGLLSV	25788	RAD54B
320	LLWGNLPEI	729533, 653820	FAM72A, FAM72B
321	KLLAVIHEL	25788	RAD54B
322	TLTNIHNL	94101	ORMDL1
323	ILVDWLQV	9133	CCNB2
324	LLYDAVHIV	2899	GRIK3
325	FLFVDPELV	146850	PIK3R6
326	KLTDVGIATL	115701	ALPK2
327	MLFGHPLLVS	8237	USP11
328	ILFPDIARA	64110	MAGEF1

Настоящее изобретение относится также в общем к применению пептидов в соответствии с настоящим изобретением для применения при лечении пролиферативных заболеваний, таких как, например, немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, почечноклеточный рак, рак головного мозга, рак желудка, колоректальный рак, гепатоклеточный рак, рак поджелудочной железы, лейкоз, рак молочной железы, меланома, рак яичника, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря и желчных протоков.

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: 311. Более предпочтительными являются пептиды – в отдельности или в комбинации – выбранные из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 217 (см. Таблицу 1) и их применение в иммунотерапии НХЛ, немелкоклеточного рака легких, мелкоклеточного рака легких, почечноклеточного рака, рака головного мозга, рака желудка, колоректального рака, гепатоклеточного рака, рака поджелудочной железы, лейкоза, рака молочной железы, меланомы, рака яичника, рака мочевого пузыря, рака матки, рака желчного пузыря и желчных протоков и, предпочтительно, НХЛ.

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

Для выбранных пептидов таблицы демонстрируют, на каких дополнительных видах опухолей они были обнаружены и имели либо избыточную презентацию на более чем 5% исследованных опухолевых образцов, либо презентацию на более чем 5% исследованных опухолевых образцов с соотношением среднего геометрического для опухоли и для нормальных тканей, составляющим более 3. Избыточная презентация определяется как более высокая представленность на опухолевом образце по сравнению с образцом нормальной ткани с наивысшей презентацией. Нормальными тканями, в сравнении с которыми проводили испытание на избыточную презентацию, были: жировая ткань, ткани надпочечной железы, артерии, костного мозга, головного мозга, центрального нерва, толстой кишки, двенадцатиперстной кишки, пищевода, глаза, желчного пузыря, сердца, почки, печени, легких, лимфатических узлов, мононуклеарные лейкоциты, ткань поджелудочной железы, периферического нерва, паращитовидной железы, брюшной полости, гипофиза, плевры, прямой кишки, слюнной железы, скелетных мышц, кожи, тонкой кишки, селезенки, желудка, вилочковой железы, щитовидной железы, трахеи, мочеточника, мочевого пузыря, вены.

Таблица 4А: Пептиды в соответствии с настоящим изобретением и их конкретное применение при других пролиферативных заболеваниях, в особенности при других раковых заболеваниях.

SEQ ID No.	Последовательность	Другие релевантные органы / заболевания
1	LLSGQLPTI	ХЛЛ, рак матки
2	LLSEETPSA	НМРЛ, МРЛ, ХЛЛ, ОМЛ, РМЖ, меланома, рак мочевого пузыря, рак матки
3	LTIDTQYYL	ХЛЛ, рак матки
5	VLQGLTFTL	МРЛ, ХЛЛ, РМЖ, меланома, РЯ, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
6	TLITLPLLFL	ХЛЛ, меланома

SEQ ID No.	Последовательность	Другие релевантные органы / заболевания
7	NLLGMIFSM	ХЛЛ, ОМЛ, меланома, рак мочевого пузыря
8	ALYAVIEKA	ХЛЛ, ОМЛ
9	FLLDLDPLL	ХЛЛ
10	FLLVGTQIDL	ХЛЛ, РМЖ, рак матки
11	GLDTVALL	КРК, ХЛЛ, ОМЛ, РМЖ, рак матки
12	GLLLLVPLL	Меланома, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
13	HLVPASWKL	ХЛЛ, меланома
15	IIIEDLLEA	РМЖ, меланома, рак матки
16	TLIAAILYL	ХЛЛ, ОМЛ, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
17	VIPLLSSV	ХЛЛ, ОМЛ, РМЖ, меланома
19	VLEAILPLV	ХЛЛ
20	YLIAGGDRWL	НМРЛ, ПКК, ХЛЛ, РМЖ, меланома
21	ALFKEAYSL	Рак пищевода
23	ALVEDIINL	КРК, РМЖ, меланома, рак матки
24	AVLGFSFRL	ХЛЛ
25	FLDTSNQHLL	ХЛЛ
26	FLGSFIDHV	Меланома, РЯ, рак матки
27	FLNQESFDL	ХЛЛ, РМЖ, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак матки
28	FLSNANPSL	ХЛЛ, РМЖ, рак матки
29	ILSDVTQGL	ХЛЛ, РМЖ, рак матки
30	ILSTLDVEL	КРК, меланома, рак матки
31	KLYDEESLL	ХЛЛ, ОМЛ, меланома, рак пищевода, рак матки
32	VLNEDELPSV	ХЛЛ
33	LLANIVPIAMLV	ХЛЛ
34	LLWEDGVTEA	КРК, ХЛЛ, меланома, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
35	SLSSERYYL	РЯ
36	VILDIPLLFET	ХЛЛ, РМЖ, меланома, рак матки
37	VLGNALEGV	ГКК, ХЛЛ, ОМЛ, рак мочевого пузыря, рак матки
38	YLTAEILELAGN	НМРЛ, МРЛ, КРК, ГКК, РМЖ, меланома, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
39	QLLPQGIVPAL	ХЛЛ, РМЖ, РЯ, рак мочевого пузыря, рак матки
40	FLNSVIVDL	ХЛЛ, меланома, рак мочевого пузыря
41	ILASIFETV	НМРЛ, МРЛ, ПКК, ХЛЛ, ОМЛ, РМЖ, меланома, рак мочевого пузыря, рак

SEQ ID No.	Последовательность	Другие релевантные органы / заболевания
		желчного пузыря, рак желчных протоков
42	YLQDLVERA	ХЛЛ, рак матки
43	ALLEGVKNV	ХЛЛ, меланома, РЯ
44	FIIEEQSFL	ХЛЛ, рак пищевода, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
45	FILDDSAlyL	ХЛЛ, рак матки
46	FLVEEIFQT	МРЛ, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
47	GLLPKLTAL	ПКК, рак головного мозга, КРК, ГКК, ОМЛ, меланома, рак пищевода, РЯ, рак матки
48	KILDEDLYI	ХЛЛ, РМЖ, меланома, рак пищевода, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
50	LLLDGLIYL	ХЛЛ
53	FLREYFERL	ХЛЛ, меланома, рак матки
55	ILVEVDLVQA	ХЛЛ, рак матки
56	GLQDLLFSL	ХЛЛ, ОМЛ
57	LQIGDFVSV	МРЛ, ХЛЛ
58	QLAPFLPQL	РЯ, рак мочевого пузыря
59	RLHREVAQV	Рак пищевода
60	SLLIDVITV	ХЛЛ, меланома, рак мочевого пузыря, рак матки
61	SLLNKDLSL	Рак матки
62	ALAPYLDLL	ОМЛ, меланома, рак мочевого пузыря
63	ALIEEAYGL	ХЛЛ
64	FLVEVSNDV	ХЛЛ, рак матки
65	NLTDVSPDL	ХЛЛ, рак матки
67	LLATVNVAL	ХЛЛ, рак матки
68	QIAAFLFTV	ХЛЛ, рак мочевого пузыря, рак матки
69	TLLAFPLLL	ГКК, ХЛЛ, ОМЛ, меланома, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
70	VLIEILQKA	ОМЛ, РМЖ, РЯ, рак мочевого пузыря, рак матки
73	YLGEEYPEV	МРЛ, КРК, ХЛЛ, меланома, рак матки
74	SLDLRPLEV	ПКК, РЖ
76	ALADLVPVDVVV	МРЛ, ХЛЛ, РМЖ, меланома, рак матки
77	ALLDVSNNYGI	ГКК, ХЛЛ, рак пищевода, РЯ, рак мочевого пузыря
78	AMEEAVAQV	ПКК, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
79	AMKEEKEQL	ОМЛ
80	YLFDEIDQA	ХЛЛ, ОМЛ, рак матки
81	FIFSYITAV	ХЛЛ

SEQ ID No.	Последовательность	Другие релевантные органы / заболевания
82	FLIDGSSSV	ХЛЛ
83	FLMDDNMSNTL	Меланома
84	FLQELQLEHA	ХЛЛ
85	GLAPAEVVVATVA	ХЛЛ, меланома
86	GLATIRAYL	ПКК, меланома, рак матки
87	GLFARIIMI	Рак желчного пузыря, рак желчных протоков
88	GLFDNRSGLPEA	Рак мочевого пузыря, рак матки
90	HLDEVFLEL	МРЛ
92	KLLFEIASA	ХЛЛ, ОМЛ
93	KLLGSLQLL	ПКК, РМЖ
94	LLAGQATTAYF	ПКК
95	LLFDLIPVVS	ОМЛ, РМЖ, рак матки
96	LLNENESLFL	ГКК, ХЛЛ, РМЖ, меланома, РЯ, рак матки
97	LLNFSPGNL	КРК
98	MLQDGIARL	ХЛЛ, меланома
100	RLIRTIAAI	ПКК
101	SLDQSTWNV	ХЛЛ
102	SLFAAISGMIL	ХЛЛ
103	SLQDHLEKV	ГКК, ХЛЛ
104	VLLGLPLL	ХЛЛ, ОМЛ
105	VLTPVILQV	ХЛЛ, ОМЛ
106	VLVELLYQI	Рак желчного пузыря, рак желчных протоков
108	YLAPENGYLM	МРЛ, КРК, ГКК, РМЖ, меланома, РЯ, рак мочевого пузыря, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
109	YLFQFSAAL	ПКК, РПЖ
110	YQYPFVLGL	Рак матки
114	GLSDISPST	ХЛЛ, рак матки
116	SLLDNLLTI	ГКК, ХЛЛ, ОМЛ, меланома
117	VLATILAQL	МРЛ, ОМЛ, рак матки
118	VLDGMIYAI	Рак матки
119	ELCDIILRV	Меланома
120	VLLGTTWAL	ОМЛ
121	YLTGYNFTL	Рак матки
122	AISEAQESV	ПКК, ХЛЛ, РМЖ, рак матки
124	FLGVVPTV	ХЛЛ, меланома, РЯ, рак матки
125	FVAPPTAAV	Меланома, рак мочевого пузыря, рак матки
126	GLSIFYRL	Меланома, рак мочевого пузыря
127	HLMEENMIVYV	Меланома
128	KLFDASPTFFA	ХЛЛ, рак желчного пузыря, рак желчных протоков

SEQ ID No.	Последовательность	Другие релевантные органы / заболевания
129	SLFEASQQL	ХЛЛ, меланома, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
130	VIFSYYVLGV	ОМЛ, рак матки
131	VLIEETDQL	ХЛЛ, меланома
132	VLQDQVDEL	ХЛЛ, ОМЛ, меланома
133	ALEELTGFREL	Рак пищевода
138	NLINNIFEL	ХЛЛ, ОМЛ, рак мочевого пузыря
141	FLGELTLQL	Меланома
144	GLITQVDKL	ОМЛ
146	GLLQQPPAL	ОМЛ
148	ICAGHVPGV	ОМЛ, рак матки
149	ILNPVTTKL	ОМЛ
152	KIMYTLVSV	ГКК
161	NLMLELETV	Рак матки
163	SIFDAVLKGV	ПКК, КРК, РМЖ, рак матки
164	SLFDGAVISTV	МРЛ, рак матки
165	KLLEEIEFL	ПКК, ОМЛ, РМЖ, меланома, рак пищевода, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
166	SLFSEVASL	Меланома
169	SSLEENLLHQV	ГКК, ХЛЛ
171	TLLDVISAL	ОМЛ
174	VLVEITDVDFAA	Меланома
179	FVDTNLYFL	ПКК, ХЛЛ, меланома, рак матки
180	GILQLVESV	ГКК, ХЛЛ, ОМЛ, меланома, РЯ
181	LLFDQNDKV	ПКК, ГКК, РМЖ, меланома, рак мочевого пузыря, рак матки
182	LLPPPPVA	МРЛ, ХЛЛ, меланома
183	VLFETVLT	ХЛЛ, ОМЛ, рак мочевого пузыря, рак матки
184	AVLGTSWQL	КРК, ХЛЛ, ОМЛ
185	FIAQLNNVEL	Меланома, РЯ
186	FLDVSRDFV	МРЛ, ХЛЛ
188	GLEDEMYEV	ХЛЛ, меланома, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
189	SLSHLVPAL	ХЛЛ
190	GLIELVDQL	ГКК, ХЛЛ, ОМЛ, меланома, рак матки
191	GLSDISAQV	ХЛЛ, меланома, рак пищевода, РЯ
193	SLADSMPSL	РМЖ, рак матки
194	SLAPFDREPFTL	НМРЛ
195	ALIPDLNQI	Рак матки
197	YLLTDNVVKL	ПКК, РМЖ
198	GLLSAVSSV	ОМЛ, рак желчного пузыря, рак

SEQ ID No.	Последовательность	Другие релевантные органы / заболевания
		желчных протоков
200	YLLDFEDRL	ХЛЛ
201	YLNISQVNV	ХЛЛ
203	ILDTIFHKV	Меланома
204	RLCDIVNV	Меланома
206	SAVSGQWEV	ХЛЛ
207	GLVGLLEQA	МРЛ, ГКК, ХЛЛ, ОМЛ, РМЖ, меланома, РЯ, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
208	FLAVSLPLL	ХЛЛ
209	FLLDTISGL	КРК, ГКК, ХЛЛ, ОМЛ, РМЖ, меланома, рак мочевого пузыря, рак матки
210	FLAEQFEFL	ХЛЛ
211	FIDDLFAFV	ГКК, ХЛЛ, ОМЛ, меланома
212	FLIGQGAHV	ХЛЛ, ОМЛ, меланома
213	YINEDEYEV	ХЛЛ, РЯ
214	FLFDGSMSL	ОМЛ
215	QLFEEEEIEL	ПКК, рак пищевода, РЯ, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
216	KVVSNLPAI	ОМЛ, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
217	AQFGAVLEV	ОМЛ, меланома
218	ALDQFLEGI	ХЛЛ, РМЖ, рак мочевого пузыря, рак матки
219	ALLELENSV	ГКК, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
221	FLAPDNSLLLA	Рак желчного пузыря, рак желчных протоков
222	FLIETGTLL	ХЛЛ, РМЖ, рак матки
223	FLQDIPDGLFL	ХЛЛ
224	FLSPLLPLL	ГКК, ХЛЛ
225	GTYQDVGSLNIGDV	ХЛЛ
226	GVIDPVPEV	ГКК, ХЛЛ, ОМЛ, меланома, РЯ, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
227	IIAEGIP EA	МРЛ, ХЛЛ, меланома, рак матки
228	IIAEYLSYV	ХЛЛ
229	ILSPWGAEV	ХЛЛ, ОМЛ, меланома, рак мочевого пузыря
230	IMDDDSYGV	ХЛЛ
232	KVMEGTVAA	ХЛЛ
233	MLEVHIPS V	ХЛЛ
234	NLQRTVVTV	ПКК, ХЛЛ, рак матки
235	SLDVYELFL	КРК, РМЖ, меланома, рак пищевода, РЯ, рак мочевого пузыря, рак матки,

SEQ ID No.	Последовательность	Другие релевантные органы / заболевания
		рак желчного пузыря, рак желчных протоков
236	SLFDGFFLTA	ХЛЛ, ОМЛ, меланома, рак матки
237	YLDRLIPQA	ГКК, ОМЛ, меланома
238	YQYGAVVTL	ХЛЛ
239	VLIDDTVLL	ГКК, ОМЛ, меланома
240	ALVPTPALFYL	РМЖ
241	FIPDFIPAV	МРЛ
242	GILDFZVFL	ОМЛ
243	GLPDLDIYL	ГКК, ХЛЛ, ОМЛ, меланома, рак матки
244	ILEPFLPAV	Меланома, рак матки
245	KLIQLPVVYV	ХЛЛ, РМЖ, РЯ, рак мочевого пузыря
246	KLPVPLESV	ХЛЛ, меланома
247	KVLEMETTV	Рак матки
248	NLLEQFILL	НМРЛ, МРЛ, ПКК, рак головного мозга, КРК, ГКК, ХЛЛ, ОМЛ, меланома, рак мочевого пузыря, рак матки
249	VLLESLVEI	Меланома, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
250	VLTNVGAAL	ХЛЛ, рак матки
251	VLVELFTYI	ХЛЛ
252	YLGDLIMAL	ХЛЛ
253	YSDDDVPSV	НМРЛ, МРЛ, ХЛЛ, меланома, рак пищевода, РЯ, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
254	FLYSETWNI	ГКК, ХЛЛ, ОМЛ, меланома
255	GMWNPAPVFL	ГКК, ХЛЛ, рак матки
257	FLQEWVYA	ХЛЛ, ОМЛ, меланома, рак мочевого пузыря
258	RIYPFLLMV	НМРЛ, МРЛ, ПКК, ГКК, ХЛЛ, ОМЛ, меланома, рак мочевого пузыря, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
259	TVLDGLEFKV	МРЛ, ХЛЛ, ОМЛ, меланома, рак матки
260	RLDEAFDFV	Меланома, рак мочевого пузыря, рак матки
261	FLPETRIMTSV	МРЛ, ХЛЛ, меланома, РЯ, рак мочевого пузыря
263	GLMDNEIKV	НМРЛ, ПКК, ГКК, РПЖ, меланома, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
264	ILTGTPPGV	РМЖ
265	ILWHFVASL	ХЛЛ, рак матки
266	QLTEMLPSI	МРЛ, ГКК, меланома, рак желчного пузыря, рак желчных протоков

SEQ ID No.	Последовательность	Другие релевантные органы / заболевания
267	SLLETGSDLLL	ГКК, рак пищевода
268	VLFPLPTPL	ХЛЛ
270	VVVDSDSLAFV	МРЛ, ХЛЛ, меланома, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
271	YLLDQPVLEQRL	ХЛЛ, меланома
273	AILLPQPPK	ПКК, ХЛЛ, меланома, РЯ
274	KLLNLISKL	ОМЛ
277	FLIDLNSTHGTFL	ХЛЛ
278	FLLFINHRL	ХЛЛ
279	NLAGENILNPL	ХЛЛ, рак мочевого пузыря, рак матки
280	SLLNHLPYL	ХЛЛ
281	TLQTVPLTTV	ХЛЛ
282	YLLEQGAQV	МРЛ, ГКК, ХЛЛ, меланома
283	ALMPVTPQA	ХЛЛ
284	KLQEQIHRV	ОМЛ
285	SITAVTPLL	ПКК, ОМЛ
287	ILMGHSLYM	Рак желчного пузыря, рак желчных протоков
288	RLAPEIVSA	ГКК
289	SLLAANNLL	ГКК, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
290	IASPVIAAV	ГКК, РПЖ, ХЛЛ, ОМЛ, РМЖ, меланома, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
291	KIIDTAGLSEA	ХЛЛ
292	KLINSQISL	ХЛЛ
293	GLAMVEAISYV	ХЛЛ, рак мочевого пузыря, рак матки
294	KLYGPEGLELV	ХЛЛ
296	FILEPLYKI	ХЛЛ, рак пищевода, РЯ, рак матки
299	RLLEEEGVSL	КРК, ОМЛ, РМЖ
301	LQFDGIHVV	МРЛ, рак головного мозга
302	SLAELDEKISA	НМРЛ, ХЛЛ, меланома, рак пищевода, рак мочевого пузыря
303	FWWEASHYL	НМРЛ, ХЛЛ, рак пищевода, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
304	ALIRLDDLFL	ПКК, ХЛЛ, меланома
305	AMLAQQMQL	ХЛЛ, РМЖ
306	AQVALVNEV	Рак мочевого пузыря, рак матки
308	SLLDQIPEM	ПКК, ХЛЛ, ОМЛ, РМЖ, меланома, РЯ, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
309	SLSFVSPSL	ХЛЛ, РМЖ, рак пищевода, рак матки
310	VMAEAPPGV	Рак матки

SEQ ID No.	Последовательность	Другие релевантные органы / заболевания
311	YLHRQVA AV	МРЛ, меланома, РЯ, рак мочевого пузыря

НМРЛ= немелкоклеточный рак легких, МРЛ= мелкоклеточный рак легких, ПКК= рак почки, КРК= рак толстой или прямой кишки, РЖ= рак желудка, ГКК= рак печени, РПЖ= рак поджелудочной железы, РМЖ= рак молочной железы, РЯ= рак яичника, ОМЛ= острый миелоидный лейкоз, ХЛЛ= хронический лимфоцитарный лейкоз.

Таблица 4Б: Пептиды в соответствии с настоящим изобретением и их конкретное применение при других пролиферативных заболеваниях, в особенности при других раковых заболеваниях (поправка к Таблице 4А).

Для выбранных пептидов таблица демонстрирует, как и Таблица 4А, на каких дополнительных видах опухолей они были обнаружены с избыточной презентацией (включая специфическую презентацию) на более чем 5% исследованных опухолевых образцов, или презентацией на более чем 5% исследованных опухолевых образцов с соотношением среднего геометрического для опухоли и для нормальных тканей, составляющим более 3. Избыточная презентация определяется как более высокая представленность на опухолевом образце по сравнению с образцом нормальной ткани с наивысшей презентацией. Нормальными тканями, в сравнении с которыми проводили испытание на избыточную презентацию, были: жировая ткань, ткани надпочечной железы, артерии, костного мозга, головного мозга, центрального нерва, толстой кишки, двенадцатиперстной кишки, пищевода, глаз, желчного пузыря, сердца, почки, печени, легких, лимфатических узлов, мононуклеарные лейкоциты, ткань поджелудочной железы, паращитовидной железы, периферического нерва, брюшной полости, гипофиза, плевры, прямой кишки, слюнной железы, скелетных мышц, кожи, тонкой кишки, селезенки, желудка, щитовидной железы, трахеи, мочеточника, мочевого пузыря, вены.

SEQ ID NO.	Последовательность	Другие релевантные органы / заболевания
2	LLSEETPSA	ПлККГШ
3	LTIDTQYYL	ПлККГШ
5	VLQGLTFTL	ПлККГШ
11	GLDTVVALL	ПлККГШ
12	GLLLLVP LL	РЯ, рак пищевода, ПлККГШ

16	TLIAAILYL	МРЛ, ПлККГШ
23	ALVEDIINL	Рак мочевого пузыря, ОМЛ, ПлККГШ
24	AVLGFSFRL	ОМЛ
26	FLGSFIDHV	МРЛ, ОМЛ
28	FLSNANPSL	МРЛ, ПлККГШ
30	ILSTLDVEL	МРЛ, рак мочевого пузыря, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, ОМЛ, ПлККГШ
33	LLANIVPIAMLV	Меланома
36	VILDIPLLFET	МРЛ, ОМЛ, ПлККГШ
37	VLGNALEGV	МРЛ
38	YLTAEILELAGN	ПлККГШ
39	QLLPQGIVPAL	ГКК
41	ILASIFETV	ПлККГШ
43	ALLEGVKNV	МРЛ, РМЖ
44	FIIEEQSFL	ОМЛ, ПлККГШ
46	FLVEEIFQT	ОМЛ
47	GLLPKLTAL	ПлККГШ
48	KILDEDLYI	ОМЛ, ПлККГШ
54	DIFDAMFSV	ХЛЛ
55	ILVEVDLVQA	Рак пищевода
56	GLQDLLFSL	Меланома
60	SLLIDVITV	НМРЛ, МРЛ, РЖ, КРК, РПЖ, РМЖ, ОМЛ
61	SLLNKDLSL	Рак пищевода, ОМЛ, ПлККГШ
66	KLAPIPVEL	ХЛЛ, ОМЛ
67	LLATVNVAL	ПлККГШ
68	QIAAFLFTV	ОМЛ
69	TLLAFPLLL	ПлККГШ
70	VLIEILQKA	МРЛ, ПлККГШ
71	VLLDYVGNVQL	ПлККГШ
73	YLGEEYPEV	ПлККГШ
76	ALADLVPVDVV V	ПлККГШ
88	GLFDNRSGLPE A	ОМЛ, ПлККГШ
95	LLFDLIPVVS	ПлККГШ
96	LLLNENESLFL	ПлККГШ
99	QLYDGATALFL	ПлККГШ
103	SLQDHLEKV	Рак матки
106	VLIELLYI	ПлККГШ
107	VQAVSIPEV	ХЛЛ, ОМЛ
108	YLAPENGYLM	Рак матки, ОМЛ, ПлККГШ
109	YLFQFSAAL	ПлККГШ
110	YQYPFVLGL	ПлККГШ
111	YLLDTLLSL	ОМЛ, ПлККГШ

115	LLIDIIHFL	ОМЛ
121	YLTGYNFTL	ОМЛ
122	AISEAQESV	ПлККГШ
124	FLGVVPTV	ОМЛ, ПлККГШ
128	KLFDASPTFFA	РЯ, ПлККГШ
131	VLIEETDQL	РМЖ
144	GLITQVDKL	Рак пищевода
146	GLLQQPPAL	ПлККГШ
152	KIMYTLVSV	ОМЛ
163	SIFDAVLKGV	ГКК, рак мочевого пузыря, ПлККГШ
166	SLFSEVASL	ОМЛ
168	SLLSPLLSV	ПлККГШ
171	TLLDVISAL	ПлККГШ
179	FVDTNLYFL	ОМЛ
182	LLPPPPPVA	ПлККГШ
183	VLFETVLTl	ПлККГШ
185	FIAQLNNVEL	ОМЛ
188	GLEDEMYEV	ПлККГШ
191	GLSDISAQV	ОМЛ
194	SLAPFDREPFT L	Меланома, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, ПлККГШ
198	GLLSAVSSV	ПлККГШ
201	YLNISQVNV	ОМЛ
205	TLFYESPHL	ХЛЛ
212	FLIGQGAHV	ГКК
213	YINEDEYEV	ПлККГШ
214	FLFDGMSL	Рак мочевого пузыря
216	KVVSNLPAI	ПКК
217	AQFGAVLEV	ПКК
218	ALDQFLEGI	ПлККГШ
220	FLAEAPTAL	ОМЛ
221	FLAPDNSLLLA	ОМЛ
224	FLSPLLPLL	ОМЛ
226	GVIDPVPEV	ПлККГШ
227	IIAEGIPeA	ПКК, ПлККГШ
228	IIAEYLSYV	ОМЛ, ПлККГШ
235	SLDVYELFL	ПлККГШ
236	SLFDGFFLTA	ПКК, РЖ
239	VLIDDTVLL	Рак матки
240	ALVPTPALFYL	ПлККГШ
244	ILEPFLPAV	ХЛЛ, ОМЛ
246	KLPVPLESV	ОМЛ
247	KVLEMETTV	РМЖ
248	NLLEQFILL	ПлККГШ

251	VLYELFTYI	ОМЛ, ПлККГШ
252	YLGDLIMAL	ОМЛ
253	YSDDDVPSV	ОМЛ, ПлККГШ
254	FLYSETWNI	ПлККГШ
255	GMWNP NAPVFL	ПлККГШ
256	ALQETPPQV	ОМЛ
258	RIYPFLLMV	КРК
259	TVLDGLEFKV	ПлККГШ
260	RLDEAFDFV	ПКК, ХЛЛ
263	GLMDNEIKV	ПлККГШ
265	ILWHFVASL	ОМЛ
267	SLLETGSDLLL	Рак мочевого пузыря, ОМЛ
268	VLFP LPTPL	ОМЛ
280	SLLNHLPYL	ПлККГШ
281	TLQTVPLTTV	ОМЛ
282	YLLEQGAQV	ОМЛ, ПлККГШ
289	SLLAANNLL	ОМЛ
290	IASPVIAAV	НМРЛ, МРЛ, КРК, рак матки
291	KIIDTAGLSEA	ПлККГШ
292	KLINSQISL	ОМЛ
296	FILEPLYKI	ОМЛ
297	ILQNGLETL	Рак желчного пузыря, рак желчных протоков, ОМЛ
299	RLLEEEGVSL	Меланома
300	IVLERNPEL	ОМЛ
301	LQFDGIHVV	ПлККГШ
302	SLAELDEKISA	Рак матки, ПлККГШ
303	FVWEASHYL	ОМЛ, ПлККГШ
306	AQVALVNEV	Рак пищевода, ОМЛ
307	FLLPVAVKL	ПлККГШ
308	SLLDQIPEM	ПлККГШ
309	SLSFVSPSL	ОМЛ, ПлККГШ
314	LIDDKGTIKL	Рак мочевого пузыря

НМРЛ= немелкоклеточный рак легких, МРЛ= мелкоклеточный рак легких, ПКК= рак почки, КРК= рак толстой или прямой кишки, РЖ= рак желудка, ГКК= рак печени, РПЖ= рак поджелудочной железы, РМЖ= рак молочной железы, ХЛЛ= хронический лимфоцитарный лейкоз, ОМЛ= острый миелоидный лейкоз, РЯ= рак яичника, ПлККГШ= плоскоклеточная карцинома головы и шеи.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID No. 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9,

10, 11, 13, 16, 17, 19, 20, 24, 25, 27, 28, 29, 31, 32, 33, 34, 36, 37, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 48, 50, 53, 54, 55, 56, 57, 59, 60, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 73, 76, 77, 80, 81, 82, 84, 85, 92, 96, 98, 101, 102, 103, 104, 105, 107, 114, 116, 122, 124, 128, 129, 131, 132, 138, 169, 179, 180, 182, 183, 184, 186, 188, 189, 190, 191, 195, 200, 201, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 218, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 232, 233, 234, 236, 238, 243, 244, 245, 246, 248, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 257, 258, 259, 260, 261, 265, 268, 270, 271, 273, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 290, 291, 292, 293, 294, 296, 302, 303, 304, 305, 308, и 309 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения ХЛЛ.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID No. 1, 2, 3, 5, 10, 11, 15, 23, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 34, 36, 37, 38, 39, 42, 45, 47, 53, 55, 60, 61, 64, 65, 67, 68, 70, 73, 76, 80, 86, 87, 88, 95, 96, 103, 108, 110, 114, 117, 118, 121, 122, 124, 125, 129, 130, 148, 161, 163, 164, 179, 181, 183, 188, 190, 193, 195, 207, 209, 215, 218, 219, 222, 227, 234, 235, 236, 239, 243, 244, 247, 248, 250, 253, 255, 259, 260, 265, 270, 279, 289, 290, 293, 296, 302, 303, 306, 308, 309, и 310 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения рака матки.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID No. 2, 20, 38, 41, 194, 248, 253, 258, 263, 302 и 303 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения НМРЛ.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID No. 2, 7, 8, 11, 16, 17, 31, 37, 41, 47, 56, 62, 69, 70, 79, 80, 92, 95, 104, 105, 116, 117, 120, 130, 132, 138, 144, 146, 148, 149, 165, 171, 180, 183, 184, 190, 198, 207, 209, 211, 212, 214, 216, 217, 226, 229, 236, 237, 239, 242, 243, 248, 254, 257, 258, 259, 274, 284, 285, 290, 299, 23, 24, 26, 30, 36, 44, 46, 48, 60, 61, 66, 68, 88, 107, 108, 111, 115, 121, 124,

152, 166, 179, 185, 191, 201, 220, 221, 224, 228, 244, 246, 251, 252, 253, 256, 265, 267, 268, 281, 282, 289, 292, 296, 297, 300, 303, 306, 309 и 308 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения ОМЛ.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID No. 2, 5, 10, 11, 15, 17, 20, 23, 27, 28, 29, 36, 38, 39, 41, 43, 48, 60, 70, 76, 93, 95, 96, 108, 122, 131, 163, 165, 181, 193, 197, 207, 209, 218, 222, 235, 240, 245, 247, 264, 290, 299, 305, 308, и 309 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения РМЖ.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID No. 2, 5, 6, 7, 12, 13, 15, 17, 20, 23, 26, 30, 31, 33, 34, 36, 38, 40, 41, 43, 47, 48, 53, 56, 60, 62, 69, 73, 76, 83, 85, 86, 96, 98, 108, 116, 119, 124, 125, 126, 127, 129, 131, 132, 141, 165, 166, 174, 179, 180, 181, 182, 185, 188, 190, 191, 194, 203, 204, 207, 209, 211, 212, 217, 226, 227, 229, 235, 236, 237, 239, 243, 244, 246, 248, 249, 253, 254, 257, 258, 259, 260, 261, 263, 266, 270, 271, 273, 282, 290, 299, 302, 304, 308, и 311 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения меланомы.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID No. 2, 5, 7, 27, 34, 35, 37, 38, 39, 40, 41, 58, 60, 62, 68, 70, 77, 88, 108, 125, 126, 138, 181, 183, 209, 218, 229, 235, 245, 248, 253, 257, 258, 260, 261, 279, 293, 302, 306, 23, 30, 163, 214, 267, 314 и 311 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения рака мочевого пузыря.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID NO: 5, 12, 16, 30, 34,

38, 41, 44, 46, 48, 69, 78, 87, 106, 108, 128, 129, 165, 188, 194, 198, 207, 215, 216, 219, 221, 226, 235, 249, 253, 258, 263, 266, 270, 287, 289, 290, 297, 303, и 308 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения рака желчного пузыря и/или рака желчных протоков.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID No. 5, 12, 26, 35, 39, 43, 47, 58, 70, 77, 96, 108, 124, 128, 180, 185, 191, 207, 213, 215, 226, 235, 245, 253, 261, 273, 296, 308, и 311 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения РЯ.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID No. 11, 23, 30, 34, 38, 47, 60, 73, 97, 108, 163, 184, 209, 235, 248, 258, 290, и 299 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения КРК.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID No. 12, 21, 27, 31, 34, 44, 47, 48, 55, 59, 61, 77, 133, 144, 165, 191, 215, 235, 253, 267, 296, 302, 303, 306, и 309 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения рака пищевода.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID No. 20, 41, 47, 74, 78, 86, 93, 94, 100, 109, 122, 163, 165, 179, 181, 197, 215, 234, 248, 258, 263, 273, 285, 304, 216, 217, 227, 236, 260, и 308 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения ПКК.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в

соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID No. 37, 38, 39, 47, 69, 77, 96, 103, 108, 116, 152, 163, 169, 180, 181, 190, 207, 209, 211, 212, 219, 224, 226, 237, 239, 243, 248, 254, 255, 258, 263, 266, 267, 282, 288, 289, и 290 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения ГKK.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID No. 60, 109, 263 и 290 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения РПЖ.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID No. 47, 248 и 301 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения рака головного мозга.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID No. 2, 3, 5, 11, 12, 16, 23, 28, 30, 36, 38, 41, 44, 47, 48, 61, 67, 69, 70, 71, 73, 76, 88, 95, 96, 99, 106, 108, 109, 110, 111, 122, 124, 128, 146, 163, 168, 171, 182, 183, 188, 194, 198, 213, 218, 226, 227, 228, 235, 240, 248, 251, 253, 254, 255, 259, 263, 280, 282, 291, 301, 302, 303, 307, 308, и 309 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения ПлККГШ.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID No. 2, 5, 16, 26, 28, 30, 36, 37, 38, 41, 43, 46, 60, 70, 73, 76, 90, 108, 117, 164, 182, 186, 207, 227, 241, 248, 253, 258, 259, 261, 266, 270, 282, 301, 311, и 290 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения МРЛ.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID No. 60, 74 и 236 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения РЖ.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению пептидов в соответствии с настоящим изобретением для – предпочтительно комбинированного – лечения пролиферативного заболевания, выбранного из группы: НХЛ, немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, почечноклеточный рак, рак головного мозга, рак желудка, колоректальный рак, гепатоклеточный рак, рак поджелудочной железы, лейкоз, рак молочной железы, меланома, рак яичника, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря и желчных протоков.

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: 311.

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, в частности, к клонированным ТКР, встроенным в аутологичные или аллогенные Т-клетки, и способам их получения, а также к естественным киллерным клеткам (NK) или другим клеткам, экспрессирующим и/или несущим указанный ТКР или вступающим в перекрестную реакцию с указанными ТКР.

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

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

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

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

Настоящее изобретение далее относится к способу в соответствии с настоящим изобретением, где антигенпрезентирующая клетка включает вектор экспрессии, способный экспрессировать или экспрессирующий указанный пептид, содержащий последовательность с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No.: 311, предпочтительно содержащий SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 217 или его вариантную аминокислотную последовательность.

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

Настоящее изобретение далее относится к способу уничтожения клеток-мишеней у пациента, чьи клетки-мишени аберрантно экспрессируют полипептид, включающий любую аминокислотную последовательность в

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

Настоящее изобретение далее относится к применению любого описанного пептида, нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, вектора экспрессии в соответствии с настоящим изобретением, клетки в соответствии с настоящим изобретением, активированного Т-лимфоцита, Т-клеточного рецептора или антитела или других молекул, связывающихся с пептидом и/или комплексом пептид-МНС в соответствии с настоящим изобретением в качестве 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 относится далее к применению в соответствии с настоящим изобретением, где указанные раковые клетки являются клетками НХЛ, немелкоклеточного рака легких, мелкоклеточного рака легких, почечноклеточного рака, рака головного мозга, рака желудка, колоректального рака, гепатоклеточного рака, рака поджелудочной железы, лейкоза, рака молочной железы, меланомы, рака яичника, рака мочевого пузыря, рака матки, рака желчного пузыря и желчных протоков и, предпочтительно, клетками НХЛ.

Настоящее изобретение далее относится к биомаркерам, основанным на пептидах в соответствии с настоящим изобретением, в контексте изобретения называемые «мишенями», которые могут быть использованы при постановке диагноза рака, предпочтительно НХЛ. В роли маркера может выступать избыточная презентация самого(их) пептида(ов) или избыточная экспрессия соответствующего(их) гена(ов). Эти маркеры могут также использоваться для предсказания вероятности успеха лечения, предпочтительно иммунотерапии, и, наиболее предпочтительно, иммунотерапии, направленной на ту же мишень,

которая была идентифицирована биомаркером. Например, для окрашивания срезов опухоли для выявления присутствия интересующего пептида в комплексе с МНС может использоваться антитело или растворимый ТКР.

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

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

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

ACHE кодирует ацетилхолинэстеразу, которая гидролизует нейротрансмиттер, ацетилхолин в нервно-мышечных соединениях и холинергических синапсах головного мозга и, таким образом, прекращает передачу сигнала (RefSeq, 2002). ACHE может быть маркером и регулятором апоптоза. Он участвует в адгезии, дифференциации и пролиферации клеток и представляет собой многообещающий ген-супрессор опухоли (Greig et al., 2013; Xi et al., 2015). ACHE и BCHE задействованы в онкогенезе, однако их взаимосвязь пока еще не выяснена (Shan, 2004a). ACHE имеет аномальную экспрессию при менингиоме, глиоме, акустической невриоме, раке легких, раке толстой кишки, фибросаркоме и раке яичника (Russo et al., 2006; Shan, 2004a; Shan, 2004b). Лечение миастенического синдрома Ламберта-Итона, который имеет идиопатическую и опухолиассоциированную форму, включает применение ингибиторов ацетилхолинэстеразы (Mareska and Gutmann, 2004; Verschuuren et al., 2006). Сплайс-формы пептидов родительской молекулы ACHE, в равной степени как и сам родительский белок, могут выступать независимо в роли сигнальной молекулы (Bukowska, 2005; Halliday and Greenfield, 2012).

ACN9 (также известный как фактор сборки 3 комплекса сукцинатдегидрогеназы (SDHAF3)) кодирует гомолог ACN9 и локализован на хромосоме 7q21.3 (RefSeq,

2002). Неправильность или отсутствие сборки комплекса SDH может привести к развитию рака и нейродегенеративных синдромов (Van Vranken et al., 2015). Различные однонуклеотидный полиморфизмы (ОНП) гена ACN9 ассоциируется с раком молочной железы (Kibriya et al., 2009).

CDC42 кодирует белок 42 цикла клеточного деления, который является малой ГТФ-азой подсемейства Rho, которая регулирует сигнальные пути, контролирующие различные клеточные функции, включая клеточную морфологию, миграцию, эндоцитоз и прохождение клеточного цикла (RefSeq, 2002). CDC42 контролирует полярность клеток эпителия, а также полярность мигрирующих клеток в комбинации с другими регуляторами (Gandalovicova et al., 2016). c-Cbl ингибируется при глиобластомах и базальноподобном раке молочной железы за счет изменений в белках Cool-1/betapix и CDC42 (Noble et al., 2015). Факторы обмена CDC42, так называемые белки семейства Dock причастны к раковым заболеваниям (Gadea and Blangy, 2014). CDC42 является RhoГТФазой, локализованной в зоне плотных контактов клеток эпителия (Lane et al., 2014; Zihni and Terry, 2015). CDC42 способен активировать STAT3, который избыточно экспрессируется при некоторых видах рака (Raptis et al., 2011). Нарушение регуляции CDC42 причастно к раковым процессам. Было продемонстрировано, что сигнальный путь с участием CDC42 играет роль в трансформации, делении, инвазии, миграции клеток, образовании инвадоподий, ферментной активности, образовании филоподий, изменении актинового цитоскелета и полярности клеток. CDC42 регулирует инвазию при глиобластоме (Stengel and Zheng, 2011; Albergaria et al., 2011; Kwiatkowska and Symons, 2013; Qadir et al., 2015; Lin and Zheng, 2015). Активированная CDC42-ассоциированная киназа 1 (ACK1/TNK2) является онкогенной киназой. p21-активированная киназа (PAK) 5 – это нисходящая эффекторная киназа CDC42, и она экспрессируется в избытке при нескольких видах рака. Уровень PAK1 повышен при раке и ассоциируется с прогрессированием опухоли. CDC42-связывающие киназы, связанные с миотонической дистрофией (MRCK), ассоциируются с раком у человека (Mahajan and Mahajan, 2010; Eswaran et al., 2012; Maruta, 2014; Unbekandt and Olson, 2014; Dammann et al., 2014; Wen et al., 2014; Mahajan and Mahajan, 2015). CDC42 контролирует активность поляризованной атипичной протеинкиназы C (Prehoda, 2009). Ось CDC42-

IQGAP1 может активировать индуцированную *H. Pylori* карциному желудка за счет негативной регуляции супрессоров опухоли E-кадгерин и бета-1-интегрин (White et al., 2009; Osman et al., 2013). CDC42 регулируется за счет сигнального пути mTORC2 и, возможно, за счет сигнального пути Notch (Dotto, 2008; Zhou and Huang, 2011). Tiam1, GEFs и RhoA являются активаторами CDC42, тогда как Slit2 и Robo1 являются ингибиторами. CDC42 регулируется CXCL12 и DLC-1 (Boissier and Huynh-Do, 2014; Sinha and Yang, 2008; Kim et al., 2009; Ben-Baruch, 2009; Xu et al., 2010; O'Connor and Chen, 2013). CDC42 является нисходящим эффектором CD44 и HMGB1, приводящим к ангиогенезу, неограниченному репликативному потенциалу, тканевой инвазии и метастазированию (Bourguignon, 2008; Hu et al., 2014). CDC42 экспрессируется в избытке при нескольких видах рака и, возможно, коррелирует с неблагоприятным прогнозом. Избыточная экспрессия CDC42 при раке молочной железы может вносить свой вклад в накоплением ErbB1 (Hirsch and Wu, 2007; Arias-Romero and Chernoff, 2013). Расположенный в аппарате Гольджи пул CDC42 регулируется комплексом GM130 и RasGRF. Прогрессирующая потеря GM130 наблюдается при колоректальном раке (Baschieri and Farhan, 2015).

DCAKD кодирует белок, содержащий домен дефосфо-CoA-киназы и локализован на хромосоме 17q21.31 (RefSeq, 2002). Уровень DCAKD повышен при раке молочной железы (Riis et al., 2012).

HAPLN3 кодирует линкерный белок 3 для гиалуронана и протеогликана, который может быть задействован в связывании гиалуроновой кислоты и адгезии клеток (RefSeq, 2002). Генетическая подпись из трех генов, включая HAPLN3, может быть использована в качестве маркера метилирования при раке предстательной железы (Strand et al., 2014). О продукте слияния генов MFGE8 и HAPLN3 сообщалось при раке молочной железы (Varley et al., 2014). HAPLN3 гиперметилирован при раке предстательной железы (Haldrup et al., 2013). Уровень HAPLN3 повышен при раке молочной железы и может быть использован как биомаркер (Kuo et al., 2010).

JAK3 кодирует Янус Киназу 3, члена семейства Янус Киназ (JAK) тирозинкиназ, задействованных во внутриклеточной передаче сигналов, опосредованной

рецептором цитокинов. Он преимущественно экспрессируется в иммунных клетках и передает сигналы с участием рецепторов интерлейкина в ответ на его активацию за счет фосфорилирования тирозина (RefSeq, 2002). Регуляция JAK3 нарушена при различных видах рака, включая Т-клеточную лимфому кожи, экстранодальную NK/Т-клеточную лимфому назального типа, острый лимфобластный лейкоз, почечноклеточную карциному и карциному толстой кишки (Lin et al., 2005; de et al., 2013; Bouchekioua et al., 2014; Sibbesen et al., 2015; Losdyck et al., 2015). Экспрессия JAK3 влияет на его нисходящие мишени STAT3, STAT5, MAPK, pS6, супрессор опухоли микроРНК miR-22, Bcl-2, Bcl-X, циклин D2, p21 и p27. Поэтому JAK2 контролирует рост, апоптоз клеток и ход клеточного цикла (Lin et al., 2005; Sibbesen et al., 2015; Agarwal et al., 2015).

KDM2B кодирует лизиндеметилазу 2B, члена семейства белков F-бокса, которые характеризуются мотивом из приблизительно 40 аминокислот, называемым F-боксом. Белки F-бокса представляют собой одну из четырех субъединиц убиквитинпротеинлигазного комплекса, называемого SCF (SKP1-куллин-F-букс), который участвует в убиквитинировании, зависящем от фосфорилирования (RefSeq, 2002). Избыточная экспрессия KDM2B приводит к усилению миграции клеток за счет связывания с ассоциированными с миграцией генами (Rohde et al., 2016). MiR-448, избыточно экспрессирующийся при раке желудка, снижает уровень KDM2B. Мус – это ключевая мишень KDM2B (Hong et al., 2016). KDM2B опосредует развитие кроветворных клеток и демонстрирует противоположные функции в прогрессировании опухоли (Andricovich et al., 2016). KDM2B – это ко-репрессор BCL6 (Oliviero et al., 2015). KDM2B участвует в сигнальном пути PI3K/mTOR и способствует пролиферации клеток и ингибирует апоптоз клеток при назофарингеальной карциноме (Ren et al., 2015). Локальное образование фумарата ингибирует KDM2B, приводя к активации репарации ДНК (Jiang et al., 2015). Истощение KDM2B вызывает p53-зависимую блокировку роста (Penzo et al., 2015). Внутренние тандемные дубликации BCOR PFUD могут быть обнаружены в опухолях почек и головного мозга в детском возрасте. BCORL1 является частью комплекса 1 белков группы Polycomb (PRC1.1), который мобилизуется KDM2B, чтобы способствовать репрессии генов. PRC1.1 представляет важность для лейкозных стволовых клеток, и снижение уровня членов комплекса, например, KDM2B, снижает

уровень пролиферации клеток (Yamamoto et al., 2014; He et al., 2013; Blackledge et al., 2014; van den Boom et al., 2016; Wong et al., 2016). KDM2B – это элемент, который не является фактором Яманаки, и он задействован в перепрограммировании клеток (Liang et al., 2012; Liu et al., 2015). При раке мочевого пузыря KDM2B участвует в клеточной пролиферации, миграции и ангиогенезе (Kottakis et al., 2011). KDM2B экспрессируется в избытке при нескольких видах заболеваний, включая базальноподобный трижды негативный рак молочной железы и рак поджелудочной железы, и регулирует пролиферацию клеток, хроматиновую структуру и старение клеток HeLa. Он является положительным регулятором гликолиза, глютаминолиза и синтеза пиримидина (Tzatsos et al., 2011; Tzatsos et al., 2013; Kottakis et al., 2014; Bacalini et al., 2015; Yu et al., 2015). KDM2B является онкогеном, участвующим в развитии лейкоза за счет нарушения Nsg2-опосредованной дифференциации (He et al., 2011; Nakamura et al., 2013; Ueda et al., 2015). KDM2B является NF-каппа-B-зависимым антиапоптотическим белком. KDM2B-зависимая деградация c-Fos негативно регулирует пролиферацию клеток (Ge et al., 2011; Han et al., 2016).

KDM5B кодирует белок JARID1B, лизин-специфическую гистондеметилазу, которая способна подавлять определенные гены-супрессоры опухоли путем деметилирования лизина 4 в гистоне H3 (RefSeq, 2002). Являясь эпигенетическим фактором, KDM5B способствует пролиферации, миграции и инвазии плоскоклеточной карциномы полости рта человека, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПлККГШ), рака молочной железы и рака легких за счет подавления экспрессии p53 (Shen et al., 2015; Tang et al., 2015; Zhao and Liu, 2015; Lin et al., 2015). Также известный под названием JARID1B, KDM5B способствует метастазированию и эпителиально-мезенхимальному переходу при различных видах опухолей за счет сигнального пути PTEN/AKT (Tang et al., 2015).

PTTG1 кодирует белок 1, трансформирующий опухоль гипофиза. Кодируемый белок является дрожжевым гомологом белков, который предотвращает стимуляцию сепаринами расхождения сестринских хроматид. Это субстрат комплекса, стимулирующего анафазу (APC), который ассоциируется с

сепарином до активации APC (RefSeq, 2002). PTTG1 экспрессируется в избытке при различных видах раковых заболеваний, в том числе при раке полости рта, шейки матки, молочной железы, предстательной железы и кожи. Высокие уровни белка ассоциируются с метастазами и неблагоприятным клиническим исходом (Noll et al., 2015; Yoon et al., 2012; Huang et al., 2012; Zhang et al., 2014; Chen et al., 2015). Уровень PTTG1 повышен при активации комплекса mTOR 1. PTTG1 ингибирует TGF-бета-1-зависимое фосфорилирование SMAD3, стимулируя рост клеток (Zhang et al., 2015; Chen et al., 2016).

PTTG2 кодирует белок 2, трансформирующий опухоль гипофиза, и локализован на хромосоме 4p12 (RefSeq, 2002). Избыточная экспрессия гена PTTG2 наблюдалась при глиомах высокой степени злокачественности, тогда как PTTG2 не экспрессировался на высоком уровне в тканях рака печени пациентов (Yang et al., 2013; Cho-Rok et al., 2006). Повышенные уровни PTTG26 как было продемонстрировано, способствуют пролиферации и инвазии клеток в процессе прогрессирования глиобластомы (Guo et al., 2016).

SMC2 (также называемый CAP-E или SMC2L1) кодирует члена семейства белков поддержания структуры хромосом, который крайне важен для конденсации хромосом в митозе и репарации ДНК (RefSeq, 2002). Ген SMC2 изменен мутацией сдвига рамки считывания, и потеря экспрессии при раке желудка и колоректальном раке с микросателлитной нестабильностью позволяет предположить, что SMC2, возможно, задействован в патогенезе опухоли (Je et al., 2014). Изменения в гене SMC2 могут играть роль в геномной нестабильности, что ускоряет накопление других изменений при пиоторакс-ассоциированных лимфомах (Ham et al., 2007).

TMEM67 кодирует трансмембранный белок 67 и локализован на первичных цилиях и плазменной мембране. Этот ген выполняет функции в процессе миграции центриолей к апикальной мембране и образования первичных цилий. Дефекты этого гена являются причиной синдрома Меккеля 3 типа (MKS3) и синдрома Жубера 6 типа (JBTS6) (RefSeq, 2002). TMEM67 участвует в образовании цилий, и дефекты цилий может вызвать колобому глаз, опухоли

языка и медуллобластоме (Han et al., 2010; Parisi, 2009; Yang et al., 2015; Han and Alvarez-Buylla, 2010).

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

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

Понятие «Т-клеточный ответ» означает специфическую пролиферацию и активацию эффекторных функций, индуцированных пептидом *in vitro* или *in vivo*. Для цитотоксических Т-клеток, рестриктированных по МНС I класса, эффекторными функциями может быть лизис клеток-мишеней, нагруженных пептидом, нагруженных предшественником пептида, или клеток-мишеней, естественно 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, 12, 13 или 14 или длиннее и в случае пептидов, связанных с молекулами МНС II класса (удлиненные варианты пептидов по изобретению), они могут иметь длину в 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 эпитоп или эпитопы. Олигопептиды типично бывают менее чем около 30 аминокислотных остатков в длину и более чем около 15 аминокислот в длину.

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

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

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

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

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

подробная информация представлена в работе Chanock и соавт. (Chanock et al., 2004).

Аллель	Популяция	Рассчитанный фенотип по частоте аллеля
A*02	Европеоидная раса (Северная Америка)	49,1%
A*02	Афроамериканцы (Северная Америка)	34,1%
A*02	Монголоиды (Северная Америка)	43,2%
A*02	Латиноамериканцы (Северная Америка)	48,3%
DR1	Европеоидная раса (Северная Америка)	19,4%
DR2	Европеоидная раса (Северная Америка)	28,2%
DR3	Европеоидная раса (Северная Америка)	20,6%
DR4	Европеоидная раса (Северная Америка)	30,7%
DR5	Европеоидная раса (Северная Америка)	23,3%
DR6	Европеоидная раса (Северная Америка)	26,7%
DR7	Европеоидная раса (Северная Америка)	24,8%
DR8	Европеоидная раса (Северная Америка)	5,7%
DR9	Европеоидная раса (Северная Америка)	2,1%
DR1	Афроамериканцы (Северная Америка)	13,20%
DR2	Афроамериканцы (Северная Америка)	29,80%
DR3	Афроамериканцы (Северная Америка)	24,80%
DR4	Афроамериканцы (Северная Америка)	11,10%
DR5	Афроамериканцы (Северная Америка)	31,10%
DR6	Афроамериканцы (Северная Америка)	33,70%
DR7	Афроамериканцы (Северная Америка)	19,20%
DR8	Афроамериканцы (Северная Америка)	12,10%
DR9	Афроамериканцы (Северная Америка)	5,80%
DR1	Монголоиды (Северная Америка)	6,80%
DR2	Монголоиды (Северная Америка)	33,80%
DR3	Монголоиды (Северная Америка)	9,20%
DR4	Монголоиды (Северная Америка)	28,60%
DR5	Монголоиды (Северная Америка)	30,00%
DR6	Монголоиды (Северная Америка)	25,10%
DR7	Монголоиды (Северная Америка)	13,40%
DR8	Монголоиды (Северная Америка)	12,70%
DR9	Монголоиды (Северная Америка)	18,60%
DR1	Латиноамериканцы (Северная Америка)	15,30%
DR2	Латиноамериканцы (Северная Америка)	21,20%
DR3	Латиноамериканцы (Северная Америка)	15,20%
DR4	Латиноамериканцы (Северная Америка)	36,80%
DR5	Латиноамериканцы (Северная Америка)	20,00%
DR6	Латиноамериканцы (Северная Америка)	31,10%
DR7	Латиноамериканцы (Северная Америка)	20,20%
DR8	Латиноамериканцы (Северная Америка)	18,60%
DR9	Латиноамериканцы (Северная Америка)	2,10%

Аллель	Популяция	Рассчитанный фенотип по частоте аллеля
A*24	Филиппины	65%
A*24	Русские ненцы	61%
A*24:02	Япония	59%
A*24	Малайзия	58%
A*24:02	Филиппины	54%
A*24	Индия	47%
A*24	Южная Корея	40%
A*24	Шри-Ланка	37%
A*24	Китай	32%
A*24:02	Индия	29%
A*24	Западная Австралия	22%
A*24	США	22%
A*24	Россия, Самара	20%
A*24	Южная Америка	20%
A*24	Европа	18%

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

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

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

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

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

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

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

Кодирующая область может быть получена из не мутировавшего («нормального»), мутировавшего или измененного гена или может даже быть

получена из последовательности ДНК, или же гена, целиком синтезированного в лаборатории с использованием методов, хорошо известных специалистам области синтеза ДНК.

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

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

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

Понятие «праймер» означает короткую последовательность нуклеиновой кислоты, которая может быть спарена с одной нитью ДНК с получением

свободного конца 3'ОН, на котором ДНК-полимераза начинает синтезировать дезоксирибонуклеотидную цепь.

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

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

Полинуклеотиды и рекомбинантные или иммуногенные полипептиды, раскрытые в соответствии с настоящим изобретением, могут также быть в «очищенной» форме. Понятие «очищенный» не требует абсолютной чистоты; скорее оно предназначено для дачи относительного определения и может включать препараты с высокой очисткой или препараты только с частичной очисткой, в соответствии с тем, как эти термины понимаются специалистами соответствующей области. Например, отдельные клоны, выделенные из библиотеки кДНК, как обычно очищались до электрофоретической гомогенности. Очистка исходного материала или природного материала от примесей по меньшей мере на один порядок величины, предпочтительно два или три порядка, и, более предпочтительно, четыре или пять порядков величины определено рассматривается в изобретении. Более того, определено включен заявленный полипептид, чистота которого составляет, предпочтительно, 99,999% или по меньшей мере 99,99% или 99,9%; и даже желательно 99% по массе или более.

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

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

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

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

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

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

- (ii) каждая брешь в Контрольной последовательности и

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

- (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: 311 или ее вариант, который на 88% гомологичен последовательностям с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 311, 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: 311. 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: 311, 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 6: Варианты и мотив пептида в соответствии с SEQ ID NO: 2, 5 и 8.

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

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

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

истинный эпитоп. Предпочтительно, чтобы остатки, которые примыкают к истинному эпитопу, существенно не влияли на протеолитическое расщепление, необходимое для презентации истинного эпитопа во время процессинга.

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

Таблица 7: Комбинации элонгаций пептидов по изобретению

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

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

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

В альтернативном варианте осуществления пептид удлинен с одной или другой стороны или с двух сторон одновременно добавлением более 4 аминокислот, предпочтительно, до общей длины вплоть до 30 аминокислот. Это может

привести к образованию пептидов, связывающихся с МНС II класса. Связывание с МНС II класса может быть проверено известными из уровня техники способами.

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

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

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

В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения пептид состоит или по существу состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 311.

«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: 311, или его вариант, содержит дополнительные находящиеся на N- и/или С-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, $-\text{CH}_2\text{-NH}$, $-\text{CH}_2\text{S-}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$, $-\text{CH=CH-}$, $-\text{COCH}_2\text{-}$, $-\text{CH(ОН)CH}_2\text{-}$ и $-\text{CH}_2\text{SO-}$. В патенте США № 4 897 445 предлагается метод твердофазного синтеза непептидных связей ($-\text{CH}_2\text{-NH}$) в полипептидных цепях, который включает полипептиды, синтезированные с использованием стандартной методики, и непептидную связь, синтезированную при реакции альдегида и аминокислоты в присутствии NaCNBH_3 .

Пептиды, включающие последовательности, описанные выше, могут быть синтезированы с дополнительными химическими группами, находящимися на их аминном и/или карбоксильном концах, для увеличения стабильности, биологической доступности и/или аффинности пептидов. Например, гидрофобные группы, такие как карбобензоксильные, 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, аргининовых 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 глутаральдегидом, полиэтиленгликоль-диакрилатом и формальдегидом используется для получения гидрогелей. Химическая модификация аллергенов для иммунотерапии часто достигается при карбамоилировании цианатом калия.

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

Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к не встречающемуся в природе пептиду, где указанный пептид состоит или состоит по существу из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID No: 1 по SEQ ID No: 311 и был получен синтетическим способом (например, синтезирован) в виде фармацевтически приемлемой соли. Способы синтетического получения пептидов хорошо известны в данной области. Соли пептидов в соответствии с настоящим изобретением существенно отличаются от пептидов по своему состоянию(ям) *in vivo*, так как синтезированные пептиды не являются солями *in vivo*. Не встречающаяся в природе солевая форма пептида опосредует растворимость пептида, в частности, в контексте фармацевтических композиций, включающих пептиды, например вакцин на основе пептидов, раскрытых в настоящем описании. Достаточная и по меньшей мере существенная растворимость пептида(ов) необходима для эффективного введения пептидов субъекту, подлежащему лечению. Предпочтительно, если соли являются фармацевтически приемлемыми солями пептидов. Соли в соответствии с изобретением включают щелочные и щелочноземельные соли, такие как соли рядов Гофмейстера, включающие в качестве анионов PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , CH_3COO^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , ClO_4^- , I^- , SCN^- и в качестве катионов NH_4^+ , Rb^+ , K^+ , Na^+ , Cs^+ , Li^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} и Ba^{2+} . В частности, соли выбраны из $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, NH_4Cl , NH_4Br , NH_4NO_3 , NH_4ClO_4 , NH_4I , NH_4SCN , Rb_3PO_4 , Rb_2HPO_4 , RbH_2PO_4 , Rb_2SO_4 , $\text{Rb}_4\text{CH}_3\text{COO}$, Rb_4Cl , Rb_4Br , Rb_4NO_3 , Rb_4ClO_4 , Rb_4I , Rb_4SCN , K_3PO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , K_2SO_4 , KCH_3COO , KCl , KBr , KNO_3 , KClO_4 , KI , KSCN , Na_3PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , Na_2SO_4 , NaCH_3COO , NaCl , NaBr , NaNO_3 , NaClO_4 , NaI , NaSCN , ZnCl_2 , Cs_3PO_4 , Cs_2HPO_4 , CsH_2PO_4 , Cs_2SO_4 , CsCH_3COO , CsCl , CsBr , CsNO_3 , CsClO_4 , CsI , CsSCN , Li_3PO_4 , Li_2HPO_4 , LiH_2PO_4 , Li_2SO_4 , LiCH_3COO , LiCl , LiBr , LiNO_3 , LiClO_4 , LiI , LiSCN , Cu_2SO_4 , $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$, Mg_2HPO_4 , $\text{Mg}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, Mg_2SO_4 , $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, MgCl_2 , MgBr_2 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$, MgI_2 , $\text{Mg}(\text{SCN})_2$, MnCl_2 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, Ca_2HPO_4 , $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, CaSO_4 , $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, CaCl_2 , CaBr_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$, CaI_2 , $\text{Ca}(\text{SCN})_2$, $\text{Ba}_3(\text{PO}_4)_2$, Ba_2HPO_4 , $\text{Ba}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, BaSO_4 , $\text{Ba}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, BaCl_2 , BaBr_2 , $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$, BaI_2 и $\text{Ba}(\text{SCN})_2$. Особенно предпочтительными являются ацетат NH, MgCl_2 , KH_2PO_4 , Na_2SO_4 , KCl , NaCl и CaCl_2 , такие как например, хлоридные или ацетатные (трифторацетатные) соли.

Как правило, пептиды и варианты (по меньшей мере те, что содержат пептидные связи между аминокислотными остатками) могут быть синтезированы Fmoc-полиамидным способом твердофазного синтеза пептидов, как раскрыто у Lukas и соавт. (Lukas et al., 1981) и в прилагающихся ссылках. Временная защита N-аминогруппы производится 9-флуоренилметилоксикарбонильной (Fmoc) группой. Повторное расщепление этой высоко щелочелабильной защитной группы осуществляется при использовании 20% пиперидина в N, N-диметилформамиде. Функциональные группы боковой цепи могут быть защищены получением таких соединений, как их бутиловые эфиры (в случае серина, треонина и тирозина), бутиловые сложные эфиры (в случае глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты), бутилоксикарбонильное производное (в случае лизина и гистидина), тритильное производное (в случае цистеина) и производное 4-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфонила (в случае аргинина). Если глутамин или аспарагин являются C-терминальными остатками, для защиты амидогруппы боковой цепи используется 4,4'-диметоксибензгидрильная группа. Твердофазный носитель основан на полимере полидиметилакриламиде, состоящем из трех мономеров: диметилакриламида (каркасный мономер), бис-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 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, Фигуры 1A–P).

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 НХЛ (N = 18 A*02-положительный образец), с картинами фрагментации соответствующих синтетических контрольных пептидов с идентичными последовательностями. Поскольку пептиды были идентифицированы непосредственно в качестве лигандов молекул HLA первичных опухолей, то эти результаты дают прямое доказательство естественного процессирования и презентации идентифицированных пептидов на ткани первичной раковой опухоли, полученной от 18 пациентов, больных НХЛ.

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

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

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

Комплексы HLA-пептид из образцов ткани НХЛ были очищены, и HLA-ассоциированные пептиды были выделены и проанализированы методом ЖХ/МС (см. примеры). Все TUMAP, содержащиеся в настоящей патентной заявке, были идентифицированы с помощью этого подхода на образцах первичной НХЛ, что подтверждает их презентацию на образцах первичной НХЛ.

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

Кроме избыточной презентации пептида была исследована экспрессия мРНК исходного гена. Данные по мРНК, полученные с помощью секвенирования РНК (RNASeq) из нормальных тканей и раковых тканей (ср. Пример 2, Фигуру 2). Дополнительным источником данных о нормальных тканях служил общедоступный банк данных по экспрессии РНК из приблизительно 3000 образцов нормальных тканей (Lonsdale, 2013). Пептиды, которые получены из

белков, которые кодируются мРНК, демонстрирующей высокую степень экспрессии в раковой ткани, но ее очень низкий уровень или отсутствие в жизненно важных нормальных тканях, были включены как предпочтительные в настоящее изобретение.

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

Многие из исходных генов/белков (называемых также «белками полной длины» или «базовыми белками»), из которых были получены пептиды, были в высокой степени избыточно экспрессированы в клетках рака по сравнению с нормальными тканями – понятие «нормальные ткани» в связи с настоящим изобретением подразумевает здоровые лимфатические узлы 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 НХЛ, но не на нормальных тканях (см. Пример 1).

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

Было показано, что пептиды по настоящему изобретению способны стимулировать Т-клеточные ответы и/или избыточно презентируются и, поэтому, могут использоваться для получения антител и/или ТКР, такие как растворимые ТКР, в соответствии с настоящим изобретением (см. Пример 3, Пример 4). Кроме того, пептиды, если находятся в комплексе с соответствующей молекулой МНС, могут быть использованы для получения антител и/или ТКР, в частности растворимых ТКР, в соответствии с настоящим

изобретением. Соответствующие способы хорошо известны специалисту данной области, а также могут быть найдены в соответствующих литературных источниках. Таким образом, пептиды по настоящему изобретению пригодны для генерирования иммунного ответа в организме пациента для уничтожения опухолевых клеток. Иммунный ответ у пациента может быть индуцирован при непосредственном введении описанных пептидов или подходящих веществ-предшественников (к примеру, удлиненных пептидов, белков или нуклеиновых кислот, кодирующих эти пептиды) пациенту, в идеальном случае в комбинации с веществом, усиливающим иммуногенность (т. е. адъювантом). Можно ожидать, что иммунный ответ, вызванный такой терапевтической вакцинацией, будет высоко специфично направлен против опухолевых клеток, так как целевые пептиды по настоящему изобретению не презентуются на нормальных тканях в сравнимом количестве копий, предотвращая, тем самым, риск нежелательных аутоиммунных реакций против нормальных клеток у пациента.

Настоящее описание далее относится к Т-клеточным рецепторам (ТКР), включающим альфа-цепь и бета-цепь («альфа/бета-ТКР»). Также предложены пептиды в соответствии с изобретением, способные связываться с ТКР и антителами, если они презентуются молекулой МНС. Настоящее описание также относится к нуклеиновым кислотам, векторам и клеткам-хозяевам для экспрессии ТКР и пептидам по настоящему изобретению; и методам их применения.

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

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

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

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

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

ТКР согласно настоящему описанию предпочтительно связываются с комплексом пептида–молекула HLA с аффинностью связывания (KD) около 100 мкМ или ниже, около 50 мкМ или ниже, около 25 мкМ или ниже или около 10

мкМ или ниже. Более предпочтительными являются высокоаффинные ТКР с аффинностью связывания, составляющей около 1 мкМ или ниже, около 100 нМ или ниже, около 50 нМ или ниже, около 25 нМ или ниже. Неограничивающие примеры диапазонов предпочтительной аффинности связывания для ТКР по настоящему изобретению включают значения от около 1 нМ до около 10 нМ; от около 10 нМ до около 20 нМ; от около 20 нМ до около 30 нМ; от около 30 нМ до около 40 нМ; от около 40 нМ до около 50 нМ; от около 50 нМ до около 60 нМ; от около 60 нМ до около 70 нМ; от около 70 нМ до около 80 нМ; от около 80 нМ до около 90 нМ; и от около 90 нМ до около 100 нМ.

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

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

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

ТКР по настоящему изобретению могут включать поддающуюся обнаружению метку, выбранную из группы, состоящей из радионуклида, флуорофора и биотина. ТКР по настоящему изобретению могут конъюгированы с терапевтически активным ингредиентом, таким как радионуклид, химиотерапевтическим средством или токсином.

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

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

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

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

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

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

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

первичные CD8⁺ Т-клетки, полученные у здоровых доноров, в целях повторной экспрессии альфа- и/или бета-цепей опухолеспецифических ТКР.

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

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

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

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

обеспечивая получение равного молярного соотношения цепей ТКР-альфа и ТКР-бета. (Schmitt et al. 2009). (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 и соавт., 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 и соавт., 2006).

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

Для снижения ошибочного спаривания С-концевой домен введенных цепей ТКР согласно настоящему описанию может быть модифицирован в целях стимуляции межцепочечной аффинности, при этом снижая способность введенных цепей спариваться с эндогенным ТКР. Данные стратегии могут включать замещение С-концевых доменов ТКР-альфа и ТКР-бета-цепей человека их мышинными эквивалентами (С-концевой «муринизированный» домен); получение второй межцепочечной дисульфидной связи в С-концевом домене за счет введения второго остатка цистеина в обе цепи: ТКР-альфа и ТКР-бета введенного ТКР (модификация цистеином); обмен взаимодействующими остатками в С-концевом домене ТКР-альфа и ТКР-бета-

цепей («выступ-во-впадину»); и слияние переменных доменов цепей ТКР-альфа и ТКР-бета непосредственно в CD3 ζ (слияние CD3 ζ). (Schmitt et al. 2009).

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

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

Фармацевтические композиции включают пептиды как в свободной форме, так и в форме фармацевтически приемлемой соли (см. также выше). Используемое в контексте данного изобретения понятие «фармацевтически приемлемая соль» относится к производным раскрытых пептидов, причем пептид модифицирован путем получения кислых или основных солей вещества. Например, кислые соли получают из свободного основания (как правило, где нейтральная форма лекарственного средства имеет нейтральную группу –NH₂) с применением реакции с подходящей кислотой. Подходящие кислоты для получения кислых солей включают как органические кислоты, например, уксусную кислоту, пропионовую кислоту, гликолевую кислоту, пировиноградную кислоту, щавелевую кислоту, яблочную кислоту, малоновую кислоту, янтарную кислоту, малеиновую кислоту, фумаровую кислоту, винную кислоту, лимонную кислоту, бензойную кислоту, коричную кислоту, миндальную кислоту, метансульфоновую кислоту, этансульфоновую кислоту, п-

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

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

Предпочтительно, если 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 MHC I класса, которые стимулируют CD8 Т-клетки, партнеры в слиянии или участки гибридной

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

В одном аспекте вакцина включает по меньшей мере один пептид, имеющий аминокислотную последовательность с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No 311, и по меньшей мере один дополнительный пептид, предпочтительно от двух до 50, более предпочтительно от двух до 25, еще более предпочтительно от двух до 20 и, наиболее предпочтительно, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать или восемнадцать пептидов. Пептид(ы) может(могут) быть получен(ы) из одного или более специфических ТАА и может(могут) связываться с молекулами МНС I класса.

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

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

комплементарными гомополимерными хвостами, образуя молекулы рекомбинантной ДНК.

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

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

Затем ДНК (или в случае ретровирусных векторов РНК) может экспрессироваться в подходящем хозяине для получения полипептида, включающего пептид или вариант по изобретению. Таким образом, ДНК, кодирующая пептид или вариант по изобретению, может быть использована в соответствии с известными методиками, модифицированными соответствующим образом с учетом раскрытых в данном описании идей, для конструирования вектора экспрессии, который затем используется для трансформации подходящей клетки-хозяина для экспрессии и получения полипептида по изобретению. Такие методики включают те, что раскрыты, например, в патентах США №№ 4 440 859, 4 530 901, 4 582 800, 4 677 063, 4 678 751, 4 704 362, 4 710 463, 4 757 006, 4 766 075 и 4 810 648.

ДНК (или в случае ретровирусных векторов – РНК), кодирующая полипептид, представляющий собой соединение по изобретению, может быть присоединена к обширному ряду других последовательностей ДНК для введения в соответствующего хозяина. ДНК-спутник будет зависеть от природы хозяина,

способа введения ДНК хозяину и от того, желательно ли поддержание в эписомальной или интеграционной форме.

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

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

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

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

Типичная клеточная векторная 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 (YIps) и включают дрожжевые селектируемые маркеры HIS3, TRP1, LEU2 и URA3. Плазмиды pRS413-416 являются дрожжевыми плазмидами с центромерами (Ycp). Основанные на промоторе CMV векторы (например, компании Sigma-Aldrich) обеспечивают кратковременную или устойчивую экспрессию, 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 МНС I, так и МНС II класса.

Настоящее изобретение относится также к клетке-хозяину, трансформированной с помощью полинуклеотидной векторной конструкции по настоящему изобретению. Клетка-хозяин может быть как прокариотической, так и эукариотической. Бактериальные клетки могут быть, предпочтительно, прокариотическими клетками-хозяевами при некоторых условиях и обычно являются штаммом *E. coli*, таким как, например, *E. coli* штамма DH5, имеющимся в наличии в Bethesda Research Laboratories Inc., Бетесда, Мэриленд, США, и RR1, имеющимся в наличии в Американской коллекции типовых культур («American Type Culture Collection» (ATCC), Роквил, Мэриленд, США (№ ATCC 31343). Предпочтительные эукариотические клетки-хозяева включают дрожжи, клетки насекомых и млекопитающих, предпочтительно клетки позвоночных, таких как линии фибробластных клеток и клеток толстой кишки таких видов как мышь, крыса, обезьяна или человек. Дрожжевые клетки-хозяева включают YPH499, YPH500 и YPH501, которые, как правило, имеются в наличии в Stratagene Cloning Systems, Ла Джола, Калифорния 92037, США. Предпочтительные клетки-хозяева млекопитающих включают клетки яичника китайского хомяка (CHO), имеющиеся в наличии в ATCC как CCL61, эмбриональные клетки швейцарской мыши линии NIH/3T3, имеющиеся в наличии в ATCC как CRL 1658, клетки COS-1 из почек обезьяны, имеющиеся в наличии в ATCC как CRL 1650, и клетки 293, являющиеся эмбриональными клетками почек эмбрионов человека. Предпочтительными клетками насекомых являются клетки Sf9, которые могут трансфицироваться с помощью бакуловирусных векторов экспрессии. Обзор в отношении выбора подходящих

клеток-хозяев для экспрессии представлен, например, в учебном пособии авторов Paulina Balbás и Argelia Lorence «Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols », часть первая, второе издание, ISBN 978-1-58829-262-9, и другой литературе, известной специалисту данной области.

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

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

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

изобретении предложена клетка-хозяин, включающая нуклеиновую кислоту или вектор экспрессии в соответствии с изобретением.

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

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

В другом варианте осуществления пептид, нуклеиновая кислота или вектор экспрессии по изобретению применяются в медицине. Например, пептид или его вариант может приготавливаться для внутривенного (в/в) введения, подкожного (п/к) введения, внутрикожного (в/к) введения, 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 декстране 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- α), ускоряя созревание дендритных клеток до эффективных, презентующих антиген Т-лимфоцитам, клеток (например, ГМ-КСФ, ИЛ-1 и ИЛ-4) (патент США № 5 849 589, специально включенный сюда в полном объеме путем ссылки) и действуя как иммуноадъюванты (например, ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-23, ИЛ-7, ИНФ-альфа, ИНФ-бета) (Gabrilovich et al., 1996).

Об иммуностимулирующих олигонуклеотидах CpG также сообщалось, что они усиливают эффекты адъювантов в составе вакцин. Не желая быть связанными соответствием какой-либо конкретной теории, авторы полагают, что CpG-олигонуклеотиды при активации врожденной (не приобретенной) иммунной системы действуют с помощью Toll-подобных рецепторов (TLR), в основном, TLR9. Вызванная CpG активация TLR9 усиливает антиген-специфичные гуморальные и клеточные ответы на широкий спектр антигенов, включая пептидные или белковые антигены, живые или убитые вирусы, вакцины из дендритных клеток, аутологичные клеточные вакцины и полисахаридные конъюгаты как в профилактических, так и терапевтических вакцинах. Более важно то, что улучшается созревание и дифференциация дендритных клеток, приводя к повышенной активации клеток типа TH1 и интенсивной выработке цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) даже при отсутствии помощи со стороны CD4 Т-клеток. Активация TH1, вызванная стимуляцией TLR9, сохраняется даже в присутствии вакцинных адъювантов, таких как квасцы или неполный адъювант Фрейнда (IFA), которые обычно способствуют активации TH2. CpG-олигонуклеотиды проявляют даже бóльшую адъювантную активность, если они входят в состав или вводятся в организм вместе с другими адъювантами или в таких составах как микрочастицы, наночастицы, липидные эмульсии или в подобных составах, которые в особенности необходимы для инициации сильного ответа, если антиген относительно слаб. Они также ускоряют

иммунную реакцию и позволяют снизить дозы антигена приблизительно на два порядка в сравнении с ответами антитела на полную дозу вакцины без CpG, что наблюдалось в некоторых экспериментах (Krieg, 2006). В патенте США № 6 406 705 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 неопухолегенные и первичные здоровые клетки не распознаются. Если идентифицированные аптамеры распознают не только конкретный опухолевый подтип, но и взаимодействуют с различными опухолями, это делает возможным применение аптамеров в качестве так называемых диагностических и терапевтических средств широкого спектра действия.

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

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

Могут быть отобраны аптамеры к сложным мишеням, таким как клетки и ткани и комплексы пептидов, включающих, предпочтительно состоящих из последовательности в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 311, в соответствии с настоящим изобретением с молекулой МНС, используя метод cell-SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment - систематическая эволюция лигандов при экспоненциальном обогащении).

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

Таким образом, в другом аспекте изобретения предложен способ получения рекомбинантного антитела, специфически связывающегося с главным комплексом гистосовместимости человека (МНС) I или II класса в комплексе с рестриктированным по HLA антигеном, причем способ включает: иммунизацию генетически модифицированного, не являющегося человеком млекопитающего, содержащего клетки, экспрессирующие молекулы указанного главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) I или II класса с растворимой формой молекулы МНС I или II класса в комплексе с указанным рестриктированным по HLA антигеном; выделение молекул мРНК из продуцирующих антитела клеток указанного не являющегося человеком млекопитающего; создание библиотеки фагового отображения, содержащей

фаги, экспонирующие белковые молекулы, закодированные указанными молекулами мРНК; и выделение, по меньшей мере, одного фага из указанной библиотеки фагового отображения, причем указанный, по меньшей мере, один фаг, экспонирует на поверхности указанное антитело, специфически связывающееся с указанным главным комплексом гистосовместимости человека (МНС) I или II класса в комплексе с указанным рестриктированным по HLA антигеном.

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

Соответствующие способы получения таких антител и одноцепочечных главных комплексов гистосовместимости I класса, в равной степени как и другие инструменты для получения данных антител, раскрыты в патентных заявках WO 03/068201, WO 2004/084798, WO 01/72768, WO 03/070752 и в опубликованных работах (Cohen et al., 2003a; Cohen et al., 2003b; Denkborg 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 311 или их вариант, который по меньшей мере на 88% гомологичен (предпочтительно, если он идентичен) последовательности с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 311, или их варианту, который индуцирует перекрестную реакцию Т-клеток с указанным

пептидом, где указанный пептид не является базовым полипептидом полной длины.

Настоящее изобретение далее относится к пептиду, включающему последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 311 или их вариант, который по меньшей мере на 88% гомологичен (предпочтительно, если он идентичен) SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 311, 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: 311.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Настоящее изобретение далее относится к способу в соответствии с изобретением, где антигенпрезентирующая клетка включает вектор экспрессии, способный экспрессировать указанный пептид, содержащий

последовательность с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 311 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 относится далее к применению в соответствии с изобретением, где указанные раковые клетки являются клетками НХЛ или

клетками другой солидной или гематологической опухоли, такой как немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, почечноклеточный рак, рак головного мозга, рак желудка, колоректальный рак, гепатоклеточный рак, рак поджелудочной железы, лейкоз, рак молочной железы, меланома, рак яичника, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря и желчных протоков.

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

Понятие «антитело» или «антитела» используется в контексте данного изобретения в широком смысле и включает как поликлональные, так и моноклональные антитела. В дополнение к интактным или «полным» молекулам иммуноглобулина в понятие «антитела» включены также фрагменты (например, участки CDR, фрагменты Fv, Fab и Fc) или полимеры таких молекул иммуноглобулина и гуманизированные версии молекул иммуноглобулина, при условии, что они проявляют любое из желаемых свойств (например, специфически связываются с (поли)пептидным маркером НХЛ, доставляют токсин к клетке НХЛ, экспрессирующей раковый ген-маркер на повышенном уровне и/или ингибируют активность полипептидного маркера НХЛ) 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. Специалисту будет понятно, что для генерирования антител по изобретению могут использоваться либо полипептидные-маркеры НХЛ полной длины, либо их фрагменты. Полипептид, необходимый для получения антитела по изобретению, может быть частично или полностью очищенным из природного источника или же может быть получен с использованием методики рекомбинантной ДНК.

Например, кДНК, кодирующая пептид в соответствии с настоящим изобретением, такой как пептид с последовательностью с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 311, 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 НХЛ, использованным для получения антитела по изобретению.

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

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

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

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

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

In vitro-методы также подходят для получения моновалентных антител. Расщепление антител для получения их фрагментов, в особенности Fab-фрагментов, может быть произведено при использовании стандартных методик, известных из уровня техники. К примеру, расщепление может производиться при использовании папаина. Примеры расщепления под воздействием папаина описываются в заявке WO 94/29348 и в патенте США № 4 342 566. Расщепление антител под воздействием папаина обычно приводит к двум идентичным фрагментам, связывающимся с антигеном и называемым Fab-фрагментами, каждый из которых имеет отдельный антиген-связывающий

сайт и остаточный Fc-фрагмент. В результате обработки пепсином получается фрагмент F(ab')₂ и фрагмент pFc'.

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

Антитела по изобретению могут далее включать гуманизированные антитела или человеческие антитела. Гуманизированные формы нечеловеческих (например, мышинных) антител - это химерные иммуноглобулины, иммуноглобулиновые цепи или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab' или другие антиген-связывающие субпоследовательности антител), которые содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого иммуноглобулина. Гуманизированные антитела включают человеческие иммуноглобулины (антитело-реципиент), в которых остатки из определяющего комплементарность участка (CDR) реципиента замещены остатками из CDR биологических видов, не являющихся человеком (донорское антитело), таких как мыши, крысы или кролики, имеющими желаемую специфичность, аффинность и связывающая способность. В некоторых случаях остатки Fv-каркаса (FR) человеческого иммуноглобулина замещены соответствующими

остатками нечеловеческого происхождения. Гуманизированные антитела могут также включать остатки, которые не встречаются ни в антителе-реципиенте, ни в импортированном CDR или каркасных последовательностях. Как правило, гуманизированное антитело будет включать по сути все из по меньшей мере одного и, как правило, двух переменных доменов, в которых все или по существу все участки CDR соответствуют таковым нечеловеческого иммуноглобулина, и все или по сути все из участков FR являются таковыми консенсусной последовательности иммуноглобулина человека. Оптимально, чтобы гуманизированное антитело содержало также по меньшей мере часть константного участка иммуноглобулина (Fc), как правило, человеческого иммуноглобулина.

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

Использоваться могут трансгенные животные (например, мыши), которые способны при иммунизации вырабатывать полный спектр человеческих антител при отсутствии выработки эндогенного иммуноглобулина. Например, было описано, что гомозиготная делеция гена, кодирующего участок присоединения тяжелой цепи антитела у химерных и мутантных мышей зародышевой линии, приводит к полному ингибированию выработки эндогенных антител. Перенос

генной матрицы иммуноглобулина клеток зародышевой линии человека в таких мутантных мышей зародышевой линии будет приводить к выработке человеческих антител после антигенной стимуляции. Человеческие антитела могут быть также получены в библиотеках фагового отображения.

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

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

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

Типичная суточная доза антител при монотерапии антителами может варьироваться от около 1 мкг/кг вплоть до 100 мг/кг массы тела или более в день, в зависимости от факторов, упоминаемых выше. После введения антител, предпочтительно для лечения НХЛ, эффективность терапевтического действия антител может быть оценена различными способами, хорошо известными опытному специалисту. Например, размер, количество и/или распределение рака у субъекта, проходящего лечение, может контролироваться с помощью стандартных методов визуализации опухоли. Введенное в терапевтических целях антитело, которое блокирует рост опухоли, приводит к уменьшению размера и/или предотвращает развитие новых опухолей в сравнении с течением болезни, которое бы имело место без введения антитела, и является эффективным антителом для лечения рака.

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

WO 2012/056407A1. Дополнительные способы получения описаны в патентной заявке WO 2013/057586A1.

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

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

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

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

Если антигенпрезентирующая клетка трансфицирована для экспрессии такого эпитопа, то предпочтительно, чтобы клетка включала вектор экспрессии, способный экспрессировать пептид, содержащий SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 311 или вариант такой аминокислотной последовательности.

Для получения Т-клеток *in vitro* могут быть использованы многие другие способы. Например, для получения ЦТЛ используются аутологичные опухолеинфильтрующие 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 низкоavidные антигенспецифические Т-клеточные ответы с высокой эффективностью в образцах крови. Кроме комплексов МНС-пептид, иАПК должны нести другие белки с костимуляторной активностью, такие как антитела к CD28, прикрепленные к их поверхности. Кроме того, такая основанная на иАПК система часто требует добавления соответствующих растворимых факторов, к примеру, цитокинов, таких как интерлейкин-12.

При получении Т-клеток могут быть также использованы аллогенные клетки, и этот способ подробно описывается в патентной заявке WO 97/26328, включенной сюда путем ссылки. Например, кроме клеток дрозифилы и Т2-клеток, для презентации антигенов могут использоваться другие клетки, такие как клетки яичника китайского хомяка (CHO), бакуловирус-инфицированные клетки насекомых, бактерии, дрожжи и инфицированные осповакциной клетки-мишени. Кроме того, могут быть использованы растительные вирусы (см., например, работу Porta и соавт. (Porta et al., 1994) в которой описывается разработка мозаичного вируса китайской вигны как высокопродуктивной системы презентации чужеродных пептидов.

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

Активированные Т-клетки, полученные с помощью приведенного выше способа, будут селективно распознавать клетку, которая аберрантно экспрессирует полипептид, включающий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO 311.

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

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

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

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

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

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

Кроме того, набор 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.

Набор 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 набор 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. Набор 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). Набор 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.

Наборы 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.

Набор 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 набора до введения пациенту могут быть предварительно смешаны, или же каждый компонент может находиться в отдельном контейнере. Компоненты набора могут быть предоставлены в виде одного или нескольких жидких растворов, предпочтительно, водного раствора, более предпочтительно, стерильного водного раствора. Компоненты набора 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 набора может быть флаконом, пробиркой, колбой, бутылкой, шприцем или любыми другими средствами, заключающими в себе твердое вещество или жидкость. Обычно, если имеется более одного компонента, набор содержит второй флакон или другой контейнер, что позволяет произвести отдельное введение. Набор может также содержать другой контейнер для фармацевтически приемлемой жидкости. Лечебный набор 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 набора.

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

Так как пептиды по изобретению были выделены из клеток НХЛ, лекарственное средство по изобретению предпочтительно используется для лечения НХЛ.

Кроме того, настоящее изобретение далее относится к способу получения персонализированного фармацевтического препарата (композиция) для отдельного пациента, включающий производство фармацевтической композиции, включающей по меньшей мере один пептид, выбранный из

хранилища предварительно прошедших скрининг пептидов TUMAP, где по меньшей мере один пептид, используемый в фармацевтической композиции, выбран по его пригодности для отдельного пациента. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция является вакциной. Способ может быть адаптирован для получения Т-клеточных клонов для дальнейшего применения, например, при выделении ТКР или растворимых антител или других методов лечения.

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

В контексте настоящего изобретения термин «хранилище» относится к группе или набору пептидов, которые предварительно прошли скрининг на иммуногенность и/или избыточную презентацию в конкретном виде опухоли. Понятие «хранилище» не подразумевает, что конкретные пептиды, включенные в вакцину, были изготовлены заблаговременно и хранились в реальном помещении, хотя эта возможность также принимается во внимание. Во внимание определено принимается тот факт, что пептиды могут быть изготовлены *de novo* для каждой производимой индивидуализированной вакцины, или могут быть получены заранее и находиться на хранении. Хранилище (например, в форме банка данных) состоит из опухолеассоциированных пептидов, которые в высокой степени избыточно экспрессировались в опухолевой ткани пациентов с НХЛ с различными HLA-A, HLA-B и HLA-C-аллелями. Оно может содержать пептиды, связанные с молекулами МНС I класса и МНС II класса или удлиненные пептиды, связанные с молекулами МНС I класса. Помимо опухолеассоциированных пептидов, выделенных из нескольких тканей НХЛ, 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 НХЛ 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 (НХЛ) 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, презентируемые в избытке или селективно презентируемые 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 НХЛ.

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

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

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

Фенотип HLA, данные транскриптомики и протеомики собирают с опухолевого материала и образцов крови пациентов для идентификации наиболее

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

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

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

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

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

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

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

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

стерильный фильтр с размером пор 0,22 мкм. Получают конечный нерасфасованный раствор.

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

Кроме того, пептиды по настоящему изобретению пригодны не только для лечения рака, но и также в качестве диагностических средств. Так как пептиды были получены из клеток НХЛ, и так как было определено, что данные пептиды не присутствуют или присутствуют в небольшом количестве в нормальных тканях, то эти пептиды могут быть использованы для диагностики наличия рака.

Присутствие заявленных пептидов на тканевых биоптатах и в образцах крови может помочь патоморфологу в постановке диагноза рака. Выявление конкретных пептидов с помощью антител, масс-спектрометрии или других методов, известных из уровня техники, могут дать патоморфологу свидетельства того, что ткань образца является злокачественной или воспаленной или пораженной заболеванием вообще, или же может использоваться в качестве биомаркера НХЛ. 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 1А – Р представлена избыточная презентация различных пептидов в нормальных тканях (белые столбцы) и тканях НХЛ (черные столбцы). Фигура 1А) символ гена: TOX2, пептид: LLSGQLPTI (SEQ ID NO.: 1); ткани слева направо: 3 жировые ткани, 3 надпочечные железы, 15 образцов клеток крови, 12 кровеносных сосудов, 10 костных мозгов, 7 головных мозгов, 8 молочных желез, 2 хрящевые ткани, 2 глаза, 3 желчных пузыря, 6 сердец, 14 почек, 19 толстых кишок, 20 печеней, 45 легких, 8 лимфатических узлов, 7 нервов, 3 яичника, 10 поджелудочных желез, 3 паращитовидные железы, 1 брюшина, 5 гипофизов, 6 плацент, 3 плевры, 3 предстательные железы, 7 слюнных желез, 5 скелетных мышц, 11 образцов кожи, 3 тонкие кишки, 11 селезенки, 5 желудков, 6 семенников, 2 вилочковые железы, 2 щитовидные железы, 9 трахей, 7

мочеточников, 8 мочевых пузырей, 5 маток, 6 пищеводов, 18 образцов НХЛ. Кроме того, пептид был выявлен на клетках 1/84 раков легких, 1/17 хронических лимфоцитарных лейкозов, 1/20 линий клеток рака поджелудочной железы, 1/20 раков яичника и 1/16 раков матки. Фигура 1B) символ гена: TAP1, пептид: VLQGLTFTL (SEQ ID NO.: 5); ткани слева направо: 3 жировые ткани, 3 надпочечные железы, 15 образцов клеток крови, 12 кровеносных сосудов, 10 костных мозгов, 7 головных мозгов, 8 молочных желез, 2 хрящевые ткани, 2 глаза, 3 желчных пузыря, 6 сердец, 14 почек, 19 толстых кишок, 20 печеней, 45 легких, 8 лимфатических узлов, 7 нервов, 3 яичника, 10 поджелудочных желез, 3 паращитовидные железы, 1 брюшина, 5 гипофизов, 6 плацент, 3 плевры, 3 предстательные железы, 7 слюнных желез, 5 скелетных мышц, 11 образцов кожи, 3 тонкие кишки, 11 селезенки, 5 желудков, 6 семенников, 2 вилочковые железы, 2 щитовидные железы, 9 трахей, 7 мочеточников, 8 мочевых пузырей, 5 маток, 6 пищеводов, 18 образцов НХЛ. Кроме того, пептид был выявлен на клетках 4/101 рака легких, 1/18 раков молочной железы, 1/17 хронических лимфоцитарных лейкозов, 2/17 раков желчных протоков и желчного пузыря, 2/16 меланом, 2/20 раков яичника и 1/15 раков мочевого пузыря. Фигура 1C) символ гена: SLC20A1, пептид: ILASIFETV (SEQ ID NO.: 41); ткани слева направо: 3 жировые ткани, 3 надпочечные железы, 15 образцов клеток крови, 12 кровеносных сосудов, 10 костных мозгов, 7 головных мозгов, 8 молочных желез, 2 хрящевые ткани, 2 глаза, 3 желчных пузыря, 6 сердец, 14 почек, 19 толстых кишок, 20 печеней, 45 легких, 8 лимфатических узлов, 7 нервов, 3 яичника, 10 поджелудочных желез, 3 паращитовидные железы, 1 брюшина, 5 гипофизов, 6 плацент, 3 плевры, 3 предстательные железы, 7 слюнных желез, 5 скелетных мышц, 11 образцов кожи, 3 тонкие кишки, 11 селезенки, 5 желудков, 6 семенников, 2 вилочковые железы, 2 щитовидные железы, 9 трахей, 7 мочеточников, 8 мочевых пузырей, 5 маток, 6 пищеводов, 18 образцов НХЛ. Кроме того, пептид был выявлен на клетках 10/101 рака легких, 4/18 острых миелолейкозов, 1/18 раков молочной железы, 1/17 хронических лимфоцитарных лейкозов, 3/20 линий клеток рака поджелудочной железы, 2/17 раков желчных протоков и желчного пузыря, 4/16 меланом, 1/20 раков яичника, 2/19 раков поджелудочной железы, 1/38 раков предстательной железы, 2/22 раков почки и 1/15 раков мочевого пузыря. Фигура 1D) символ гена: COPS7B, пептид: NLLEQFILL (SEQ ID NO.: 248); образцы слева направо: 4 клеточные

линии рака, 6 нормальных тканей (1 лимфатический узел, 3 селезенки, 1 желудок, 1 матка), 55 раковых тканей (2 рака головного мозга, 1 рак молочной железы, 1 рак слепой кишки, 6 раков толстой кишки, 6 лейкоцитарных лейкозов, 2 рака печени, 10 раков легких, 8 раков лимфатических узлов, 1 рак миелоидных клеток, 3 рака яичника, 1 рак предстательной железы, 1 рак прямой кишки, 4 рака кожи, 2 рака желудка, 3 рака мочевого пузыря, 4 рака матки). Несоответствия относительно списка видов опухолей между фигурой 1D и таблицей 4A можно объяснить более строгими критериями отбора, применявшимся в случае таблицы 4A (более подробная информация представлена в таблице 4A). Панель исследованных нормальных тканей и клеточные линии рака и ксенотрансплантаты были теми же, что и на Фигурах 1A–C. Фигура 1E) символ гена: KDM5B, пептид: LLSEETPSA (SEQ ID NO.: 2); образцы слева направо: 1 первичная культура, 40 раковых тканей (1 рак костного мозга, 1 рак головного мозга, 2 рака молочной железы, 8 раков головы и шеи, 4 лейкоцитарных лейкоза, 1 рак печени, 7 раков легких, 6 раков лимфатических узлов, 2 рака миелоидных клеток, 1 рак яичника, 3 рака кожи, 3 рака мочевого пузыря, 1 рак матки). Фигура 1F) символ гена: CDC42, пептид: FLLVGTQIDL (SEQ ID NO.: 10); образцы слева направо: 2 клеточные линии, 10 раковых тканей (2 рака молочной железы, 1 рак головы и шеи, 1 лейкоцитарный лейкоз, 1 рак легких, 4 рака лимфатических узлов, 1 рак матки). Фигура 1G) символ гена: HAPLN3, пептид: GLLLLVPLL (SEQ ID NO.: 12); образцы слева направо: 16 раковых тканей (1 рак молочной железы, 1 рак толстой кишки, 1 колоректальный рак, 1 рак пищевода, 1 рак желчного пузыря, 1 рак головы и шеи, 2 рака легких, 5 раков лимфатических узлов, 2 рака яичника, 1 рак кожи). Фигура 1H) символ гена: JAK3, пептид: HLVPASWKL (SEQ ID NO.: 13); образцы слева направо: 10 раковых тканей (1 лейкоцитарный лейкоз, 1 рак легких, 5 раков лимфатических узлов, 1 рак яичника, 1 рак кожи, 1 рак яичка). Фигура 1I) символ гена: TMEM67, пептид: FLGSFIDHV (SEQ ID NO.: 26); образцы слева направо: 1 клеточная линия, 9 раковых тканей (1 рак головного мозга, 1 рак легких, 1 рак лимфатических узлов, 1 рак миелоидных клеток, 2 рака яичника, 2 рака кожи, 1 рак матки). Фигура 1J) символы гена: PTTG1, PTTG2, пептид: ILSTLDVEL (SEQ ID NO.: 30); образцы слева направо: 29 раковых тканей (1 рак костного мозга, 2 рака толстой кишки, 1 рак желчного пузыря, 3 рака головы и шеи, 1 рак почки, 5 раков легких, 7 раков лимфатических узлов, 1 рак яичника, 5

раков кожи, 2 рака мочевого пузыря, 1 рак матки). Фигура 1K) символ гена: DCAKD, пептид: VILDIPLLFET (SEQ ID NO.: 36); образцы слева направо: 2 клеточные линии, 20 раковых тканей (1 рак головного мозга, 1 рак молочной железы, 1 колоректальный рак, 1 рак головы и шеи, 1 лейкоцитарный лейкоз, 1 рак печени, 3 рака легких, 4 рака лимфатических узлов, 1 рак миелоидных клеток, 1 рак яичника, 4 рака кожи, 1 рак матки). Фигура 1L) символ гена: KDM2B, пептид: ALLEGVKNV (SEQ ID NO.: 43); образцы слева направо: 13 раковых тканей (1 рак молочной железы, 1 лейкоцитарный лейкоз, 1 рак легких, 6 раков лимфатических узлов, 3 рака яичника, 1 рак прямой кишки). Фигура 1M) символ гена: ACHE, пептид: SLDLRPLEV (SEQ ID NO.: 74); образцы слева направо: 1 клеточная линия, 2 нормальные ткани (1 лимфатический узел, 1 селезенка), 24 раковые ткани (3 рака головного мозга, 1 рак толстой кишки, 1 рак желчного пузыря, 1 рак почки, 1 рак легких, 12 раков лимфатических узлов, 1 рак яичника, 1 рак кожи, 2 рака желудка, 1 рак яичка). Фигура 1N) символ гена: CYTB, пептид: FLYSETWNI (SEQ ID NO.: 254); образцы слева направо: 7 клеточных линий, 15 раковых тканей (1 рак толстой кишки, 2 рака головы и шеи, 3 лейкоцитарных лейкоза, 1 рак печени, 6 раков лимфатических узлов, 1 рак миелоидных клеток, 1 рак кожи). Фигура 1O) символ гена: ACN9, пептид: FLQEWVYA (SEQ ID NO.: 257); образцы слева направо: 2 клеточные линии, 11 раковых тканей (2 лейкоцитарных лейкоза, 1 рак печени, 4 рака лимфатических узлов, 1 рак миелоидных клеток, 2 рака кожи, 1 рак мочевого пузыря). Фигура 1P) символ гена: SMC2, пептид: TVLDGLEFKV (SEQ ID NO.: 259); образцы слева направо: 1 первичная культура, 14 раковых тканей (1 рак головы и шеи, 3 лейкоцитарных лейкоза, 3 рака легких, 3 рака лимфатических узлов, 1 рак миелоидных клеток, 1 рак яичника, 2 рака кожи).

На Фигурах 2A–C представлены примеры профилей экспрессии исходных генов настоящего изобретения, которые в высокой степени экспрессированы в избытке или исключительно экспрессированы при НХЛ в ряду нормальных тканей (белые столбцы) и 10 образцах НХЛ (черные столбцы). Ткани слева направо: 6 артерий, 2 образца клеток крови, 2 головных мозга, 1 сердце, 2 печени, 3 легких, 2 вены, 1 жировая ткань, 1 надпочечная железа, 5 костных мозгов, 1 хрящевая ткань, 1 толстая кишка, 1 пищевод, 2 глаза, 2 желчных пузыря, 1 почка, 6 лимфатических узлов, 4 поджелудочные железы, 2

периферических нерва, 2 гипофиза, 1 прямая кишка, 2 слюнные железы, 2 скелетные мышцы, 1 кожа, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 щитовидная железа, 7 трахей, 1 мочевого пузырь, 1 молочная железа, 5 яичников, 5 плацент, 1 предстательная железа, 1 семенник, 1 вилочковая железа, 1 матка, 10 образцов НХЛ. Фигура 2A) символ гена: MIXL1. Фигура 2B) символ гена: CCR4. Фигура 2C) символ гена: HIST1H1B.

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

На Фигурах 4A–C представлены отдельные результаты пептид-специфических ответов *in vitro* CD8⁺ Т-клеток здорового HLA-A*02⁺ донора. CD8⁺ Т-клетки примировали с помощью искусственных АПК, стимулированных моноклональными антителами к CD28 и HLA-A*02 в комплексе с пептидом с последовательностью SeqID No 253 (A, левая секция), пептидом с последовательностью SEQ ID NO: 258 (B, левая секция) и пептидом с последовательностью SEQ ID NO: 260 (C, левая секция), соответственно. После трех циклов стимуляции обнаружение клеток, реагирующих с пептидом, производилось с помощью двойного окрашивания мультимеров A*02/Seq ID No 253 (A), A*02/Seq ID No 258 (B) или A*02/Seq ID No 260 (C). Правые секции (A, B и C) представляют собой контрольное окрашивание клеток, простимулированных нерелевантными комплексами пептида и A*02. Из числа отдельных жизнеспособных клеток путем гейтирования выделяли CD8⁺ лимфоциты. Гейты Буля помогали исключить ложно-положительные ответы, обнаруженные с помощью мультимеров, специфических в отношении различных пептидов. Указывается частота выявления специфических мультимер-положительных клеток среди CD8⁺ лимфоцитов.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1:

Идентификация и количественное определение опухолеассоциированных пептидов, презентируемых на поверхности клетки

Образцы тканей

Опухолевые ткани пациентов были получены из: Asterand (Детройт, Мичиган, США и Ройстон, Хартфордшир, Великобритания); ProteoGenex Inc. (Кальвер-Сити, Калифорния, США).

Нормальные ткани были получены из компаний Asterand (Детройт, Мичиган, США и Ройстон, Хартфордшир, Великобритания); 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) и Университетской клиники г. Тюбинген (Тюбинген, Германия).

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

Выделение пептидов HLA из образцов тканей

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

Масс-спектрометрический анализ

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

микрокапиллярную колонку из плавленного кварца (75 мкм в/д x 250 мм) с обращеннофазовым сорбентом 1,7 мкм C18 (Waters) с применением скорости потока в 400 нл в минуту. Затем пептиды разделяли с использованием двухэтапного 180-минутного бинарного градиента от 10% до 33% растворителя В при скорости потока 300 нл в минуту. Для создания градиента использовали растворитель А (0,1% муравьиной кислоты в воде) и растворитель В (0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле). Позолоченный стеклянный капилляр (PicoTip, New Objective) использовали для введения в источник наноESI. Масс-спектрометры LTQ-Orbitrap работали в информационно-зависимом режиме с применением стратегии TOP5. Вкратце, цикл сканирования начинался с полного сканирования с высокой точностью масс на спектрометре Orbitrap ($R = 30\,000$), за чем следовало сканирование MS/MS также на Orbitrap ($R = 7500$) на 5 особенно многочисленных ионах-предшественниках с динамическим исключением отобранных ранее ионов. Тандемные масс-спектры интерпретировали при помощи программы SEQUEST с дополнительным контролем вручную. Идентифицированную пептидную последовательность подтверждали сравнением полученной картины фрагментации природного пептида с картиной фрагментации синтетического контрольного пептида с идентичной последовательностью.

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

ассоциирован с количественными данными, позволяющими провести относительную количественную оценку образцов и тканей. Кроме того, все количественные данные, полученные для пептидов-кандидатов, были проконтролированы вручную в целях обеспечения взаимосогласованности данных и для проверки точности автоматического метода анализа. Для каждого пептида был рассчитан профиль презентации, показывающий средний уровень презентации в образце, а также вариабельность репликаторов. В профиле сравниваются образцы ткани НХЛ с фоновым уровнем образцов нормальной ткани. Профили презентации типичных пептидов, презентуемых в избытке, показаны на Фигуре 1. Показатели презентации отдельных пептидов показаны в Таблице 8.

Таблица 8: Показатели презентации. В таблице представлены пептиды, которые в очень высокой степени избыточно презентуются на опухолях в сравнении с панелью нормальных тканей (+++), в высокой степени избыточно презентуются на опухолях в сравнении с панелью нормальных тканей (++) или избыточно презентуются на опухолях в сравнении с панелью нормальных тканей (+). Панель нормальных тканей, рассматриваемых как подходящие для сравнения с опухолями, состояла из: жировой ткани, надпочечной железы, артерии, вены, костного мозга, головного мозга, центрального и периферического нерва, толстой кишки, прямой кишки, тонкой кишки, включая двенадцатиперстную кишку, пищевода, глаза, желчного пузыря, сердца, почки, печени, легкого, лимфатического узла, мононуклеарных лейкоцитов, поджелудочной железы, парашитовидной железы, брюшины, гипофиза, плевры, слюнной железы, скелетной мышцы, кожи, селезенки, желудка, вилочковой железы, щитовидной железы, трахеи, мочеточника, мочевого пузыря.

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептида
1	LLSGQLPTI	+++
2	LLSEETPSA	+++
3	LTIDTQYYL	+++
5	VLQGLTFTL	+++
6	TLITLPLLFL	+++
7	NLLGMIFSM	+++
8	ALYAVIEKA	+++
9	FLLDLDP LL	+++

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептида
10	FLLVGTQIDL	+++
11	GLDTVVAL	+++
12	GLLLLVPLL	+++
13	HLVPASWKL	+++
15	IIIEDLLEA	+++
16	TLIAAILYL	+++
17	VIPLLSSV	+++
18	KLTDQPPLV	+++
19	VLEAILPLV	+++
20	YLIAGGDRWL	+++
21	ALFKEAYSL	+++
22	ALKKHLTSV	+++
23	ALVEDIINL	+++
24	AVLGFSFRL	+++
25	FLDTSNQHLL	+++
26	FLGSFIDHV	+++
27	FLNQESFDL	+++
28	FLSNANPSL	+++
29	ILSDVTQGL	+++
30	ILSTLDVEL	+++
31	KLYDEESLL	+++
32	VLNEDELPSV	+++
33	LLANIVPIAMLV	+++
34	LLWEDGVTEA	+++
35	SLSSERYYL	+++
36	VILDIPLLFET	+++
37	VLGNALEGV	+++
38	YLTAEILELAGN	+++
40	FLNSVIVDL	+
41	ILASIFETV	+++
43	ALLEGVKNV	+
44	FIIEEQSFL	+++
45	FILDDSAlyL	+
46	FLVEEIFQT	++
47	GLLPKLTAL	+
49	TILGDPQILL	+++
50	LLLDGLIYL	+
53	FLREYFERL	+++
54	DIFDAMFSV	+++
55	ILVEVDLVQA	++
56	GLQDLLFSL	++
57	LQIGDFVSV	+
60	SLLIDVITV	+++
61	SLLNKDLSL	+

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептида
62	ALAPYLDLL	+++
64	FLVEVSNDV	++
65	NLTDVSPDL	+++
67	LLATVNVAL	+++
69	TLLAFPLLL	+
71	VLLDYVGNVQL	+++
72	TLQEETAVYL	+++
74	SLDLRPLEV	+
75	AALKYIPSV	+++
76	ALADLVPVDVVV	+++
77	ALLDVSNNYGI	+++
78	AMEEAVAQV	+++
79	AMKEEKEQL	+++
80	YLFDEIDQA	+++
81	FIFSYITAV	+++
82	FLIDGSSSV	+++
83	FLMDDNMSNTL	+++
84	FLQELQLEHA	+++
85	GLAPAEVVVATVA	+++
86	GLATIRAYL	+++
87	GLFARIIMI	+++
88	GLFDNRSGLPEA	+++
89	GLTALHVAV	+++
90	HLDEVFLEL	+++
91	HLSSTTAQV	+++
92	KLLFEIASA	+++
93	KLLGSLQLL	+++
94	LLAGQATTAYF	+++
95	LLFDLIPVVS	+++
96	LLNENESLFL	+++
97	LLNFSPGNL	+++
98	MLQDGIARL	+++
99	QLYDGATALFL	+++
100	RLIRTIAAI	+++
101	SLDQSTWNV	+++
102	SLFAAISGMIL	+++
103	SLQDHLEKV	+++
104	VLLGLPLL	+++
105	VLTPVILQV	+++
106	VLYELLQYI	+++
107	VQAVSIPEV	+++
108	YLAPENGYLM	+++
109	YLFQFSAAL	+++
110	YQYPFVLGL	+++

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептида
111	YLLDTLLSL	+++
112	FLAILPEEV	+++
113	FVIDSFEEL	+++
114	GLSDISPST	+++
115	LLIDIIHFL	+++
116	SLLDNLLTI	+
117	VLATILAQL	+++
118	VLDGMIYAI	+++
119	ELCDIILRV	+++
120	VLLGTTWAL	+++
121	YLTGYNFTL	+++
122	AISEAQESV	+
123	ALLSAFVQL	++
124	FLGVVVPTV	+++
125	FVAPPTAAV	+++
126	GLSIFIYRL	+++
128	KLFDASPTFFA	++
131	VLIEETDQL	+++
132	VLQDQVDEL	+++
133	ALEELTGFREL	+++
134	ALGRLGILSV	+++
135	ALTGLQFQL	+++
136	FIFGIVHLL	+++
137	FIQQUERFFL	+++
138	NLINNIFEL	+
139	FLASPLVAI	+++
140	FLFEDFVEV	+++
141	FLGELTLQL	+++
142	FLYEDSKSVRL	+++
143	TLHAVDVTL	+++
144	GLITQVDKL	+++
145	GLLHEVWSL	+++
146	GLLQQPPAL	+++
147	GLSEYQRNFL	+++
148	ICAGHVPGV	+++
149	ILNPVTTKL	+++
150	ILSEKEYKL	+++
151	ILVKQSPML	+++
152	KIMYTLVSV	+++
153	KLLKGIYAI	+++
154	KLMNIQQQL	+++
155	KLMTSLVKV	+++
156	KMLEDDLKL	+++
157	KVLEFLAKV	+++

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептида
158	KVQDVLHQV	+++
159	LLLSDSGFYI	+++
160	LLPPPSPA	+++
161	NLMLELET	+++
162	RLADLKVSI	+++
163	SIFDAVLKGV	+++
164	SLFDGAVIST	+++
165	KLLEEIEFL	++
166	SLFSEVASL	+++
167	SLFSITKSV	+++
168	SLLSPLLSV	+++
169	SSLEENLLHQV	+++
170	STIELSENSL	+++
171	TLLDVISAL	+++
172	TLQDSLEFI	+++
173	VILDSVASV	+++
174	VLVEITDVDFAA	+++
175	VMESILLRL	+++
176	YLHIYESQL	+++
177	YLYEAAEATTL	+++
178	YVLQGEFFL	+++
179	FVDTNLYFL	+++
180	GILQLVESV	++
182	LLPPPPVA	+
183	VLFEIVLTI	+
185	FIAQLNNVEL	+
186	FLDVSRDFV	+
188	GLEDEMYEV	++
189	SLSHLVPAL	+
190	GLIELVDQL	++
191	GLSDISAQV	+++
194	SLAPFDREPFTL	+++
195	ALIPDLNQL	+++
196	TLALAMIYL	++
200	YLLDFEDRL	+
201	YLNISQVNV	++
203	ILDTIFHKV	+++
204	RLCDIVNV	+++
207	GLVGLLEQA	++
211	FIDDLFAFV	+++
212	FLIGQGAHV	+
213	YINEDEYEV	+
214	FLFDGMSL	++
215	QLFEEEEIEL	+

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептида
216	KVVSNLPAI	+++
217	AQFGAVLEV	+
218	ALDQFLEGI	+
219	ALLELENSV	+++
220	FLAEAPTAL	++
221	FLAPDNSLLLA	+++
222	FLIETGTLL	+
224	FLSPLLPLL	+
225	GTYQDVGSLNIGDV	+++
226	GVIDPVPEV	+
227	IIAEGIPEA	+
231	IVMGAIPSV	+
232	KVMEGTVAA	++
233	MLEVHIPSV	++
236	SLFDGFFLTA	+
237	YLDRLIPQA	++
239	VLIDDTVLL	++
242	GILDFZVFL	+
243	GLPDLDIYL	+++
244	ILEPFLPAV	+
246	KLPVPLESV	+
249	VLLESLVEI	+++
252	YLGDLIMAL	+
253	YSDDDVPSV	+++
254	FLYSETWNI	+++
255	GMWNP NAPVFL	+++
256	ALQETPPQV	+++
257	FLQEWVYA	+++
258	RIYPFLLMV	+++
259	TVLDGLEFKV	+++
260	RLDEAFDFV	++
263	GLMDNEIKV	+++
264	ILTGTTPGV	+++
265	ILWHFVASL	+++
266	QLTEMLPSI	+++
267	SLLETGSDLLL	+++
268	VLFPLPTPL	+++
269	VLQNVAFSV	+++
270	VVVDSDSLAFV	+++
271	YLLDQPVLEQRL	+++
272	KLDHTLSQI	+++
273	AILLPQPPK	+++
274	KLLNLISKL	+++
275	KLMDLED CAL	+++

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептида
276	NMISYVVHL	+++
277	FLIDLNSTHGTFL	+
279	NLAGENILNPL	++
280	SLLNHLPYL	+++
285	SITAVTPLL	+
287	ILMGHSLYM	++
289	SLLAANNLL	+++
290	IASPVIAAV	+++
291	KIIDTAGLSEA	+++
292	KLINSQISL	++
294	KLYGPEGLELV	+
296	FILEPLYKI	++
298	ALTDVILCV	+
299	RLLEEEGVSL	+
302	SLAELDEKISA	+
303	FVWEASHYL	++
305	AMLAQQMQL	+
307	FLLPVAVKL	++
308	SLLDQIPEM	+

ПРИМЕР 2:

Определение профиля экспрессии генов, кодирующих пептиды по изобретению

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

Источники и приготовление РНК

Хирургически удаленные тканевые препараты были предоставлены различными организациями, которые перечислены выше (см. Пример 1) после получения письменной формы информированного согласия от каждого

пациента. Препараты опухолевой ткани были мгновенно заморожены после операции и впоследствии гомогенизированы с помощью ступки и пестика в жидком азоте. Суммарная РНК была приготовлена из данных образцов с использованием реагента TRI (Ambion, Дармштадт, Германия) с последующей очисткой на RNeasy (QIAGEN, Хильден, Германия); оба метода осуществлялись в соответствии с указаниями производителей.

Суммарная РНК здоровых тканей человека для экспериментов по секвенированию РНК (RNASeq) была получена из: Asterand (Детройт, Мичиган, США и Ройстон, Хартфордшир, Великобритания), BioCat GmbH (Гейдельберг, Германия), BioServe (Белтсвилль, Мэриленд, США); Capital BioScience Inc. (Роквилль, 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: Asterand (Детройт, Мичиган, США и Ройстон, Хартфордшир, Великобритания); ProteoGenex Inc. (Кальвер-Сити, Калифорния, США).

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

Эксперименты по секвенированию РНК

Анализ экспрессии гена в образцах РНК опухолевой и нормальной ткани проводили способом секвенирования следующего поколения (RNAseq) лабораторией CeGaT (Тюбинген, Германия). Вкратце, библиотеки секвенирования подготавливали при использовании набора реактивов Illumina HiSeq v4 согласно протоколу производителя (Illumina Inc., Сан-Диего, Калифорния, США), в который входит фрагментация РНК, синтез кДНК и добавление адаптеров секвенирования. Библиотеки, полученные из многочисленных образцов, смешивали в эквимольном соотношении и секвенировали на системе компании Illumina HiSeq 2500 согласно инструкциям производителя, получая одноконцевые риды длиной 50 пар оснований.

Обработанные риды картируют на человеческий геном (GRCh38) с помощью программного обеспечения STAR. Данные по экспрессии представляются на уровне транскриптов в виде RPKM (число ридов на тысячу пар нуклеотидов, отнесенное на миллион картированных ридов с помощью программного обеспечения Cufflinks) и на уровне экзонов (общее число ридов, получаемых с помощью программного обеспечения Bedtools), на основании идентификаций по банку данных последовательностей ensembl (Ensembl77). Для получения значений RPKM риды экзонов нормализованы по длине экзона и размеру выравнивания. Типичные профили экспрессии исходных генов, предложенных в настоящем изобретении, которые в высокой степени экспрессированы в избытке или эксклюзивно экспрессированы в клетках НХЛ, представлены на Фигуре 2. Показатели экспрессии других отдельных генов показаны в Таблице 9.

Таблица 9: Показатели экспрессии. В таблице представлены пептиды, полученные из генов, которые в очень высокой степени избыточно экспрессируется в опухолях в сравнении с панелью нормальных тканей (+++), в высокой степени избыточно экспрессируется в опухолях в сравнении с панелью нормальных тканей (++) или избыточно экспрессируется в опухолях в сравнении с панелью нормальных тканей (+). Фоновый уровень данного балла рассчитывали по измерениям следующих соответствующих нормальных тканей: жировая ткань, надпочечник, артерия, клетки крови, костный мозг, головной мозг, хрящевая ткань, толстая кишка, пищевод, глаз, желчный пузырь, сердце, почка, печень, легкие, лимфатический узел, поджелудочная железа, гипофиз, прямая кишка, слюнная железа, скелетная мышца, кожа, тонкая кишка, селезенка, желудок, щитовидная железа, трахея, мочевого пузырь и вена. В случае, если в наличии имелись данные для нескольких образцов одного и того же вида ткани, для расчетов использовали среднее арифметическое всех соответствующих образцов.

SEQ ID No	Последовательность	Экспрессия гена
9	FLLDLDP LL	++
21	ALFKEAYSL	+
25	FLDTSNQHLL	++
30	ILSTLDVEL	++
38	YLTAEILELAGN	++

SEQ ID No	Последовательность	Экспрессия гена
43	ALLEGVKNV	+
55	ILVEVDLVQA	+
56	GLQDLLFSL	+
61	SLLNKDLSL	+
91	HLSSTTAQV	++
102	SLFAAISGMIL	+++
106	VL YELLQYI	+++
112	FLAILPEEV	++
113	FVIDSFEEL	+++
116	SLLDNLLTI	+
133	ALEELTGFREL	+
135	ALTGLQFQL	+++
142	FLYEDSKSVRL	+++
143	TLHAVDVTL	+++
146	GLLQQPPAL	+
148	ICAGHVPGV	+++
155	KLMTSLVKV	+++
157	KVLEFLAKV	+++
158	KVQDVLHQV	+++
159	LLLSDSGFYL	++
160	LLPPPSPAA	+++
161	NLMLELETV	+++
162	RLADLKVSI	+++
167	SLFSITKSV	+++
170	STIELSENSL	++
174	VLVEITDVFDA	+
175	VMESILLRL	+++
178	YVLQGEFFL	+++
183	VL FETVLT I	+
192	GMAAEV PKV	+
199	SLNSTTWKV	+++
202	ALAAGGYDV	+++
222	FLIETGTLL	++
225	GT YQDV GSLNIGDV	++
229	ILSPWGAEV	++
238	YQYGAVVTL	++
256	ALQETPPQV	+
260	RLDEAFDFV	++
268	VL FPLPTPL	+
276	NMISYVVHL	+++
294	KLYGPEGLELV	+++
297	ILQNGLET L	+++
298	ALTDVILCV	+++

ПРИМЕР 3:

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

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

Прайминг CD8⁺ Т-клеток *in vitro*

В целях проведения стимуляций *in vitro* искусственными антигенпрезентирующими клетками, нагруженными комплексом пептид-МНС (рМНС) и антителом к CD28, заявители сначала выделили CD8⁺ Т-клетки из свежего продукта лейкофереза HLA-A*02 методом позитивной селекции с помощью микросфер CD8 (Miltenyi Biotec, Бергш-Гладбах, Германия). Кровь была получена от здоровых доноров (после подписания формы информированного согласия) из Университетской клиники г. Мангейм, Германия.

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

Получение микросфер, покрытых 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).

рМНС, использованные для положительных и отрицательных контрольных стимуляций, были A*0201/MLA-001 (пептид ELAGIGILTV (SEQ ID NO. 329) из модифицированного Melan-A/MART-1) и A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI из DDX5, SEQ ID NO. 330), соответственно.

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

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

Иммуногенность *in vitro* для пептидов НХЛ

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 десяти пептидов по изобретению обобщаются в Таблицах 10А и 10Б.

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

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

Seq ID	Последовательность	лунки
319	SLYKGLLSV	++
320	LLWGNLPEI	++
321	KLLAVIHEL	++
322	TLTNIIHNL	++
323	ILVDWLQV	++
324	LLYDAVHIV	++
325	FLFVDPELV	+++

326	KLTDVGIATL	++++
327	MLFGHPLLVSV	++
328	ILFPDIIARA	++++

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

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

SEQ ID NO:	Последовательность	Положительные лунки [%]
1	LLSGQLPTI	"+++"
2	LLSEETPSA	"+"
3	LTIDTQYYL	"+"
5	VLQGLTFTL	"+++"
7	NLLGMIFSM	"++++"
8	ALYAVIEKA	"+"
9	FLLDLDP LL	"++"
12	GLLLLVP LL	"+++"
13	HLVPASWKL	"+++"
17	VIIPLLSSV	"++"
19	VLEAILPLV	"+"
21	ALFKEAYSL	"+"
22	ALKKHLTSV	"++++"
24	AVLGFSFRL	"++++"
25	FLDTSNQHLL	"+"
26	FLGSFIDHV	"+"
27	FLNQESFDL	"+"
28	FLSNANPSL	"++++"
29	ILSDVTQGL	"+"
30	ILSTLDVEL	"++"
33	LLANIVPIAMLV	"+"
35	SLSSERYYL	"++++"
36	VILDIPLLFET	"++"
37	VLGNALEGV	"+"
40	FLNSVIVDL	"+++"
41	ILASIFETV	"+++"
42	YLQDLVERA	"+++"
43	ALLEGVKNV	"++"
44	FIIEEQSFL	"+"

SEQ ID NO:	Последовательность	Положительные лунки [%]
46	FLVEEIFQT	"+"
47	GLLPKLTAL	"++"
51	SLLGNPVL	"+++"
52	VLLDVDAAFL	"+"
53	FLREYFERL	"+++"
57	LQIGDFVSV	"++++"
59	RLHREVAQV	"+"
60	SLLIDVITV	"+++"
61	SLLNKDLSL	"+"
62	ALAPYLDLL	"++"
66	KLAPIPVEL	"++"
67	LLATVNVAL	"+"
68	QIAAFLFTV	"+++"
73	YLGEEYPEV	"+"
74	SLDLRPLEV	"++"
253	YSDDDVPSV	"+++"
254	FLYSETWNI	"+"
256	ALQETPPQV	"+"
258	RIYPFLLMV	"++++"
260	RLDEAFDFV	"++++"
261	FLPETRIMTSV	"+"
262	LMGPVVHEV	"++"

ПРИМЕР 4:Синтез пептидов

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

ПРИМЕР 5:Анализ связывания МНС

Пептиды-кандидаты для Т-клеточной терапии в соответствии с настоящим изобретением далее были испытаны на их способность связываться с МНС (аффинность). Отдельные комплексы пептида и молекулы МНС были получены с помощью реакции обмена лигандами под воздействием УФ-излучения, при

которой УФ-чувствительный пептид расщепляется под воздействием УФ-излучения, и получается продукт обмена с исследуемым пептидом. Только пептиды-кандидаты, которые могут эффективно связываться и стабилизировать восприимчивые к пептиду молекулы МНС, предотвращают диссоциацию комплексов с МНС. Для определения выхода продукта реакции обмена проводили анализ методом ELISA на основе обнаружения легкой цепи ($\beta 2m$) стабилизированных комплексов с МНС. Этот анализ производили, в основном, как описано у Rodenko и соавт. (Rodenko et al., 2006).

В 96-луночные планшеты MAXISorp (NUNC) на ночь вносили 2 мкг/мл стрептавидина в PBS при комнатной температуре, промывали 4 раза и блокировали в течение 1 часа при 37°C в 2% БСА, содержащем блокирующий буфер. Полученные в результате рефолдинга мономеры HLA-A*02:01/MLA-001 служили в качестве стандарта, покрывающего диапазон 15-500 нг/мл. Мономерные комплексы пептид-МНС после реакции обмена под воздействием УФ-излучения 100-кратно разводили в блокирующем буфере. Образцы инкубировали в течение 1 ч при 37°C, промывали четыре раза, инкубировали в течение 1 ч при 37°C с 2 мкг/мл пероксидазы хрена, конъюгированной с антителом к $\beta 2m$, снова промывали и проводили обнаружение с помощью раствора ТМБ; реакцию останавливали NH_2SO_4 . Величину поглощения измеряли при длине волны 450 нм. Пептиды-кандидаты, которые демонстрировали высокий выход реакции обмена (предпочтительно более 50%, наиболее предпочтительно, более 75 %) обычно являются предпочтительными для генерирования и получения антител или их фрагментов и/или Т-клеточных рецепторов или их фрагментов, поскольку они проявляют достаточную авидность по отношению к молекулам МНС и предотвращают диссоциацию комплексов МНС.

Таблица 11: Показатели связывания с молекулами МНС I класса.

Связывание рестриктированных по молекулам HLA I класса пептидов с HLA-A*02:01 распределено по выходу пептидного обмена: $\geq 10\%$ = +; $\geq 20\%$ = ++; $\geq 50\%$ = +++; $\geq 75\%$ = ++++

SEQ ID NO:	Последовательность	Пептидный обмен
1	LLSGQLPTI	"+++"
2	LLSEETPSA	"+++"

3	LTIDTQYYL	"+++"
4	TLLGFFLAKV	"++"
5	VLQGLTFTL	"+++"
6	TLITLPLLFL	"+++"
7	NLLGMIFSM	"++++"
8	ALYAVIEKA	"+++"
9	FLLDLDPLL	"+++"
10	FLLVGTQIDL	"+++"
11	GLDTVALL	"+++"
12	GLLLLVPLL	"+++"
13	HLVPASWKL	"+++"
14	LLSDPTPGA	"++"
15	IIIEDLLEA	"++++"
16	TLIAAILYL	"++"
17	VIPLLSSV	"+++"
18	KLTDQPPLV	"+++"
19	VLEAILPLV	"++++"
21	ALFKEAYSL	"+++"
22	ALKKHLTSV	"+++"
23	ALVEDIINL	"++++"
24	AVLGFSFRL	"+++"
25	FLDTSNQHLL	"+++"
26	FLGSFIDHV	"+++"
27	FLNQESFDL	"+++"
28	FLSNANPSL	"+++"
29	ILSDVTQGL	"+++"
30	ILSTDVEL	"+++"
31	KLYDEESLL	"++++"
32	VLNEDELPSV	"+++"
33	LLANIVPIAMLV	"++++"
34	LLWEDGVTEA	"+++"
35	SLSSERYYL	"+++"
36	VILDIPLLFET	"+++"
37	VLGNALEGV	"+++"
38	YLTAEILELAGN	"++"
39	QLLPQGIVPAL	"+++"
40	FLNSVIVDL	"++++"
41	ILASIFETV	"++++"
42	YLQDLVERA	"++++"
43	ALLEGVKNV	"+++"
44	FIIEEQSFL	"+++"
45	FILDDSALYL	"+++"
46	FLVEEIFQT	"+++"
47	GLLPKLTAL	"+++"
48	KILDEDLYI	"+++"
49	TILGDPQILL	"++++"
50	LLLDGLIYL	"+++"
51	SLLGNSPVL	"++++"
52	VLLEDVDAAFL	"++++"

53	FLREYFERL	"++++"
54	DIFDAMFSV	"+"
55	ILVEVDLVQA	"++++"
56	GLQDLLFSL	"+++"
57	LQIGDFVSV	"++++"
58	QLAPFLPQL	"+++"
59	RLHREVAQV	"+++"
60	SLLIDVITV	"+++"
61	SLLNKDLSL	"++++"
62	ALAPYDLL	"++++"
63	ALIEEAYGL	"+++"
64	FLVEVSNDV	"++++"
65	NLTDVSPDL	"+++"
66	KLAPIVEL	"++++"
67	LLATVNVAL	"++++"
68	QIAAFLFTV	"++++"
69	TLLAFPLLL	"++++"
70	VLIEILQKA	"++++"
71	VLLDYVGNVQL	"++++"
72	TLQEETAVYL	"++"
73	YLGEEYPEV	"+++"
74	SLDLRPLEV	"++++"
75	AALKYIPSV	"+++"
76	ALADLVPVDVW	"++++"
77	ALLDVSNNYGI	"++++"
78	AMEEAVAQV	"+++"
79	AMKEEKEQL	"++"
80	YLFDEIDQA	"+++"
81	FIFSYITAV	"++"
82	FLIDGSSSV	"+++"
83	FLMDDNMSNTL	"+++"
84	FLQELQLEHA	"+++"
85	GLAPAEVWATVA	"+++"
86	GLATIRAYL	"+++"
87	GLFARIIMI	"++"
88	GLFDNRSGLPEA	"+++"
89	GLTALHVAV	"+++"
90	HLDEVFLEL	"+++"
91	HLSSTTAQV	"++"
92	KLLFEIASA	"+++"
93	KLLGSLQLL	"++++"
94	LLAGQATTAYF	"+++"
95	LLFDLIPVSV	"+++"
96	LLNENESLFL	"+++"
97	LLNFSPGNL	"+"
98	MLQDGIARL	"+++"
99	QLYDGATALFL	"++"
100	RLIRTIAAI	"+++"
101	SLDQSTWNV	"++++"

102	SLFAAISGMIL	"+++"
103	SLQDHLEKV	"+++"
104	VLLGLPLL	"+++"
105	VLTPVILQV	"+++"
106	VLYELLQYI	"++++"
107	VQAVSIPEV	"+++"
108	YLAPENGYLM	"+++"
109	YLFQFSAAL	"+++"
110	YQYPFVLGL	"++++"
111	YLLDTLLSL	"+++"
112	FLAILPEEV	"+++"
113	FVIDSFEEL	"+++"
114	GLSDISPST	"++"
115	LLIDIIHFL	"++++"
116	SLLDNLLTI	"+++"
117	VLATILAQL	"++++"
118	VLDGMIYAI	"+++"
119	ELCDIILRV	"+++"
120	VLLGTTWAL	"+++"
121	YLTGYNFTL	"+++"
122	AISEAQESV	"++"
123	ALLSAFVQL	"+++"
124	FLGVVPTV	"+++"
125	FVAPPTAAV	"+++"
127	HLMEENMIVYV	"+++"
128	KLFDASPTFFA	"+++"
129	SLFEASQQL	"+++"
130	VIFSYYLGV	"+++"
131	VLIEETDQL	"++"
132	VLQDQVDEL	"++"
133	ALEELTGFREL	"++"
134	ALGRLGILSV	"+++"
135	ALTGLQFQL	"+++"
136	FIFGIVHLL	"+++"
137	FIQQUERFFL	"+++"
138	NLINNIFEL	"++++"
139	FLASPLVAI	"++++"
140	FLFEDFVEV	"+++"
141	FLGELTLQL	"+++"
142	FLYEDSKSVRL	"+++"
143	TLHAVDVT	"+++"
144	GLITQVDKL	"+++"
145	GLLHEVVSL	"+++"
146	GLLQQPPAL	"+++"
147	GLSEYQRNFL	"+++"
148	ICAGHVPGV	"+++"
149	ILNPVTTKL	"+++"
150	ILSEKEYKL	"+++"
151	ILVKQSPML	"+++"

152	KIMYTLVSV	"++"
153	KLLKGIYAI	"+++"
154	KLMNIQQQL	"+++"
155	KLMTSLVKV	"+++"
156	KMLEDDLKL	"+++"
157	KVLEFLAKV	"+++"
158	KVQDVLHQV	"+++"
159	LLLSDSGFYI	"+++"
160	LLPPPSPA	"+++"
161	NLMLELETV	"+++"
162	RLADLKVSI	"++++"
163	SIFDAVLKGV	"++++"
164	SLFDGAVISTV	"+++"
165	KLLEEIEFL	"+++"
167	SLFSITKSV	"+++"
168	SLLSPLLSV	"+++"
169	SSLEENLLHQV	"+++"
171	TLLDVISAL	"++++"
172	TLQDSLEFI	"++++"
173	VILDSVASV	"++++"
174	VLVEITDVDFAA	"++++"
175	VMESILLRL	"+++"
176	YLHIYESQL	"+++"
177	YLYEAEETTL	"+++"
178	YVLQGEFFL	"+++"
179	FVDTNLYFL	"+++"
180	GILQLVESV	"+++"
181	LLFDQNDKV	"+++"
182	LLPPPPPVA	"++++"
183	VLFTVTLTI	"+++"
184	AVLGTSWQL	"+++"
185	FIAQLNNVEL	"+"
186	FLDVSRDFV	"+++"
187	FLNSFVFKM	"++"
188	GLEDEMYEV	"++"
189	SLSHLVPAL	"+++"
190	GLIELVDQL	"+++"
191	GLSDISAVQ	"+++"
192	GMAAEVPAK	"++"
193	SLADSMPSL	"++"
194	SLAPFDREPFTL	"++"
195	ALIPDLNQL	"+++"
197	YLLTDNVVKL	"++"
198	GLLSAVSSV	"+++"
199	SLNSTTWKV	"+++"
200	YLLDFEDRL	"++++"
201	YLNISQVNV	"+++"
202	ALAAGGYDV	"++"
203	ILDTIFHKV	"+++"

204	RLCDIVNV	"++"
205	TLFYESPHL	"+++"
206	SAVSGQWEV	"++"
207	GLVGLLEQA	"++++"
208	FLAVSLPLL	"+++"
209	FLLDTISGL	"+++"
210	FLAEQFEFL	"+++"
211	FIDDLFAFV	"+++"
212	FLIGQGAHV	"+++"
213	YINEDEYEV	"++"
214	FLFDGSM SL	"+++"
215	QLFEEEEIEL	"++"
216	KVVS NLPAI	"++"
217	AQFGAVLEV	"+++"
218	ALDQFLEGI	"+++"
219	ALLELENSV	"++"
220	FLAEAPTAL	"++"
221	FLAPDNSLLLA	"++++"
222	FLIETGTLL	"+++"
223	FLQDIPDGLFL	"++"
224	FLSPLLPLL	"++"
226	GVIDPVPEV	"++"
227	IIAEGIPEA	"++"
228	IIAEYLSYV	"++"
229	ILSPWGAEV	"++++"
230	IMDDDSYGV	"++"
231	IVMGAIPSV	"+++"
232	KVMEGTVAA	"++"
233	MLEVHIPSV	"+++"
234	NLQRTVVTV	"++"
235	SLDVYELFL	"+++"
236	SLFDGFFLTA	"++++"
237	YLDRLIPQA	"+++"
238	YQYGAVVTL	"+++"
239	VLIDDTVLL	"+++"
240	ALVPTPALFYL	"+++"
241	FIPDFIPAV	"++"
242	GILDFZVFL	"++++"
243	GLPDLDIYL	"++++"
244	ILEPFLPAV	"+++"
245	KLIQLPVVYV	"+++"
246	KLPVPLESV	"+++"
247	KVLEMETTV	"+++"
248	NLLEQFILL	"+++"
249	VLLESLVEI	"++++"
250	VL TNVGAAL	"+++"
251	VLYELFTYI	"+++"
252	YLGDLIMAL	"+++"
253	YSDDDVPSV	"++++"

254	FLYSETWNI	"++++"
255	GMWNP NAPVFL	"++++"
256	ALQETPPQV	"+++"
257	FLQEW EVYA	"++++"
258	RIYPFLLMV	"+++"
259	TVLDGLEFKV	"++++"
260	RLDEAFDFV	"++++"
261	FLPETRIMTSV	"++++"
262	LMGPVVHEV	"++++"
263	GLMDNEIKV	"+++"
264	ILTGTPPGV	"+++"
265	ILWHFVASL	"++++"
266	QLTEMLPSI	"++++"
267	SLLETGSDLLL	"+++"
268	VLFP LPTPL	"++++"
269	VLQNVAFSV	"++++"
270	VVVDSDSLAFV	"++++"
271	YLLDQPVLEQRL	"++++"
272	KLDHTLSQI	"++++"
273	AILLPQPPK	"++"
274	KLLNLISKL	"++++"
275	KLMDLED CAL	"++++"
276	NMISYV VHL	"++"
277	FLIDLNSTHG TFL	"+++"
278	FLLFINHRL	"+++"
279	NLAGENILNPL	"+++"
280	SLLNHLPYL	"++++"
281	TLQTVPLTTV	"++++"
282	YLLEQGAQV	"++++"
283	ALMPVTPQA	"+++"
284	KLQEQIHRV	"+++"
285	SITAVTPLL	"+++"
286	HLTEDTPKV	"+++"
287	ILMGHSLYM	"++++"
288	RLAPEIVSA	"+++"
289	SLLAANNLL	"++++"
290	IASPVIAAV	"+++"
291	KIIDTAGLSEA	"+++"
292	KLINSQISL	"+++"
293	GLAMVEAISYV	"++++"
294	KLYGPEGLELV	"++++"
295	SLAAVSQQL	"+++"
296	FILEPLYKI	"++++"
297	ILQNGLET L	"+++"
298	ALTDVILCV	"++++"
299	RLLEEEGVSL	"+++"
300	IVLERNPEL	"+++"
301	LQFDGIHV V	"+++"
302	SLAELDEKISA	"+++"

303	FWWEASHYL	"++++"
304	ALIRLDDLFL	"+++"
305	AMLAQQMQL	"+++"
306	AQVALVNEV	"+++"
307	FLLPVAVKL	"+++"
308	SLLDQIPEM	"+++"
309	SLSFVSPSL	"+++"
310	VMAEAPPGV	"+++"
311	YLHRQVAHV	"+++"
314	LIDDKGTIKL	"++"

Список цитируемой литературы

- Allison, J. P. et al., Science **270** (1995): 932-933
- American Cancer Society, (2015), www.cancer.org
- Andersen, R. S. et al., Nat.Protoc. **7** (2012): 891-902
- Appay, V. et al., Eur.J Immunol. **36** (2006): 1805-1814
- Armitage, J. O., Blood **110** (2007): 29-36
- Banchereau, J. et al., Cell **106** (2001): 271-274
- Beatty, G. et al., J Immunol **166** (2001): 2276-2282
- Beggs, J. D., Nature **275** (1978): 104-109
- Benjamini, Y. et al., Journal of the Royal Statistical Society.Series B (Methodological), **Vol.57** (1995): 289-300
- Boulter, J. M. et al., Protein Eng **16** (2003): 707-711
- Braumuller, H. et al., Nature (2013)
- Brossart, P. et al., Blood **90** (1997): 1594-1599
- Bruckdorfer, T. et al., Curr.Pharm.Biotechnol. **5** (2004): 29-43
- Card, K. F. et al., Cancer Immunol Immunother. **53** (2004): 345-357
- Chanock, S. J. et al., Hum.Immunol. **65** (2004): 1211-1223
- Cohen, C. J. et al., J Mol Recognit. **16** (2003a): 324-332
- Cohen, C. J. et al., J Immunol **170** (2003b): 4349-4361
- Cohen, S. N. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **69** (1972): 2110-2114
- Coligan, J. E. et al., Current Protocols in Protein Science (1995)
- Colombetti, S. et al., J Immunol. **176** (2006): 2730-2738

- Dengjel, J. et al., Clin Cancer Res **12** (2006): 4163-4170
- Denkberg, G. et al., J Immunol **171** (2003): 2197-2207
- Falk, K. et al., Nature **351** (1991): 290-296
- Fong, L. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **98** (2001): 8809-8814
- Gabrilovich, D. I. et al., Nat Med. **2** (1996): 1096-1103
- Gattinoni, L. et al., Nat Rev.Immunol **6** (2006): 383-393
- Gnjatic, S. et al., Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A **100** (2003): 8862-8867
- Godkin, A. et al., Int.Immunol **9** (1997): 905-911
- Green, M. R. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual **4th** (2012)
- Greenfield, E. A., Antibodies: A Laboratory Manual **2nd** (2014)
- Hwang, M. L. et al., J Immunol. **179** (2007): 5829-5838
- Inoges, S. et al., Methods Mol.Biol **1139** (2014): 367-387
- Jung, G. et al., Proc Natl Acad Sci U S A **84** (1987): 4611-4615
- Kibbe, A. H., Handbook of Pharmaceutical Excipients **rd** (2000)
- Krieg, A. M., Nat Rev.Drug Discov. **5** (2006): 471-484
- Li, Y. et al., Cancer Epidemiol. **39** (2015): 8-13
- Liddy, N. et al., Nat Med. **18** (2012): 980-987
- Ljunggren, H. G. et al., J Exp.Med. **162** (1985): 1745-1759
- Longenecker, B. M. et al., Ann N.Y.Acad.Sci. **690** (1993): 276-291
- Lonsdale, J., Nat.Genet. **45** (2013): 580-585
- Lukas, T. J. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **78** (1981): 2791-2795
- Lundblad, R. L., Chemical Reagents for Protein Modification **3rd** (2004)
- Meziere, C. et al., J Immunol **159** (1997): 3230-3237
- Morgan, R. A. et al., Science **314** (2006): 126-129
- Mori, M. et al., Transplantation **64** (1997): 1017-1027
- Mortara, L. et al., Clin Cancer Res. **12** (2006): 3435-3443
- Mueller, L. N. et al., J Proteome.Res **7** (2008): 51-61
- Mueller, L. N. et al., Proteomics. **7** (2007): 3470-3480

- Mumberg, D. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **96** (1999): 8633-8638
- National Cancer Institute, (6-5-2015), www.cancer.gov
- Palomba, M. L., Curr.Oncol Rep. **14** (2012): 433-440
- Pinheiro, J. et al., nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models (<http://CRAN.R-project.org/package=nlme>) (2015)
- Plebanski, M. et al., Eur.J Immunol **25** (1995): 1783-1787
- Porta, C. et al., Virology **202** (1994): 949-955
- Rammensee, H. et al., Immunogenetics **50** (1999): 213-219
- Rini, B. I. et al., Cancer **107** (2006): 67-74
- Rock, K. L. et al., Science **249** (1990): 918-921
- Saiki, R. K. et al., Science **239** (1988): 487-491
- Seeger, F. H. et al., Immunogenetics **49** (1999): 571-576
- SEER Stat facts, (2014), <http://seer.cancer.gov/>
- Sherman, F. et al., Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics (1986)
- Singh-Jasuja, H. et al., Cancer Immunol.Immunother. **53** (2004): 187-195
- Small, E. J. et al., J Clin Oncol. **24** (2006): 3089-3094
- Sturm, M. et al., BMC.Bioinformatics. **9** (2008): 163
- Teufel, R. et al., Cell Mol Life Sci. **62** (2005): 1755-1762
- Tran, E. et al., Science **344** (2014): 641-645
- Walter, S. et al., J Immunol **171** (2003): 4974-4978
- Walter, S. et al., Nat Med. **18** (2012): 1254-1261
- Willcox, B. E. et al., Protein Sci. **8** (1999): 2418-2423
- Zaremba, S. et al., Cancer Res. **57** (1997): 4570-4577

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептид, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No. 120, и SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 112, и SEQ ID No. 114 по SEQ ID No. 119, и SEQ ID No. 121 по SEQ ID No. 311 и их вариантных последовательностей, которые по меньшей мере на 88% гомологичны SEQ ID No. 120, и SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 112, и SEQ ID No. 114 по SEQ ID No. 119, и SEQ ID No. 121 по SEQ ID No. 311, соответственно, и где указанный вариант связывается с молекулой(ами) главного комплекса гистосовместимости (МНС) и/или индуцирует перекрестную реакцию Т-клеток с указанным вариантным пептидом; и его фармацевтически приемлемая соль, где указанный пептид не является полноразмерным полипептидом.
2. Пептид или его вариант по п.1, где указанный пептид или его вариант имеет общую длину от 8 до 100, предпочтительно от 8 до 30, и более предпочтительно от 8 до 16 аминокислот, и, наиболее предпочтительно, где пептид состоит или состоит по существу из аминокислотной последовательности в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID No. 120, и SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 112, и SEQ ID No. 114 по SEQ ID No. 119, и SEQ ID No. 121 по SEQ ID No. 311.
3. Пептид или его вариант по п.1 или п.2, где указанный пептид модифицирован и/или включает непептидные связи.
4. Пептид или его вариант по любому из пп. 1–3, где указанный пептид является частью слитого белка, в частности, включающего N-терминальные аминокислоты антиген-ассоциированной инвариантной цепи (Ii) HLA-DR.
5. Антитело, в частности растворимое или связанное с мембраной антитело, которое специфически распознает пептид или его вариант по любому из пп. 1–4, предпочтительно пептид или его вариант по любому из пп. 1–4, когда он связан с молекулой МНС.

6. Т-клеточный рецептор (ТКР), предпочтительно растворимый или связанный с мембраной, реагирующий с HLA-лигандом, где указанный лиганд характеризуется по меньшей мере 75% идентичностью, предпочтительно по меньшей мере 88% идентичностью к, или наиболее предпочтительно состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No. 120, и SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 112, и SEQ ID No. 114 по SEQ ID No. 119, и SEQ ID No. 121 по SEQ ID No. 311, причем необязательно указанный ТКР обладает дополнительной эффекторной функцией, например, несет иммуностимулирующий домен или токсин.
7. Нуклеиновая кислота, кодирующая пептид или его вариант по любому из пп. 1–4 или ТКР по п.6, необязательно связанная с гетерологичной последовательностью промотора, или вектор экспрессии, способный экспрессировать указанную нуклеиновую кислоту.
8. Рекомбинантная клетка-хозяин, включающая пептид по любому из пп. 1–4, или нуклеиновую кислоту или вектор экспрессии по п. 7, где указанная клетка-хозяин предпочтительно является антигенпрезентирующей клеткой, такой как дендритная клетка.
9. Применение пептида или его варианта по любому из пп. 1–4, нуклеиновой кислоты или вектора экспрессии по п. 7 или клетки-хозяина по п. 8 в медицине.
10. Способ получения пептида или его варианта по любому из пп. 1–4, где способ включает культивирование клетки-хозяина по п. 8, которая презентует пептид по любому из пп. 1–4 или экспрессирует нуклеиновую кислоту по п. 7 или содержит вектор экспрессии по п. 7, и выделение пептида или его варианта из клетки-хозяина или его культуральной среды.
11. Активированный Т-лимфоцит, полученный с помощью способа, включающего контактирование Т-клеток *in vitro* с нагруженными антигеном молекулами МНС человека I или II класса, экспрессированными на поверхности подходящей антигенпрезентирующей клетки или искусственной конструкции, имитирующей

антигенпрезентирующую клетку, в течение периода времени, достаточного для активации указанных Т-клеток антиген-специфическим образом, где указанный антиген является пептидом по любому из пп. 1 или 4, который селективно распознает клетку, которая презентует полипептид, включающий аминокислотную последовательность, указанную в любом из пп. 1 или 4.

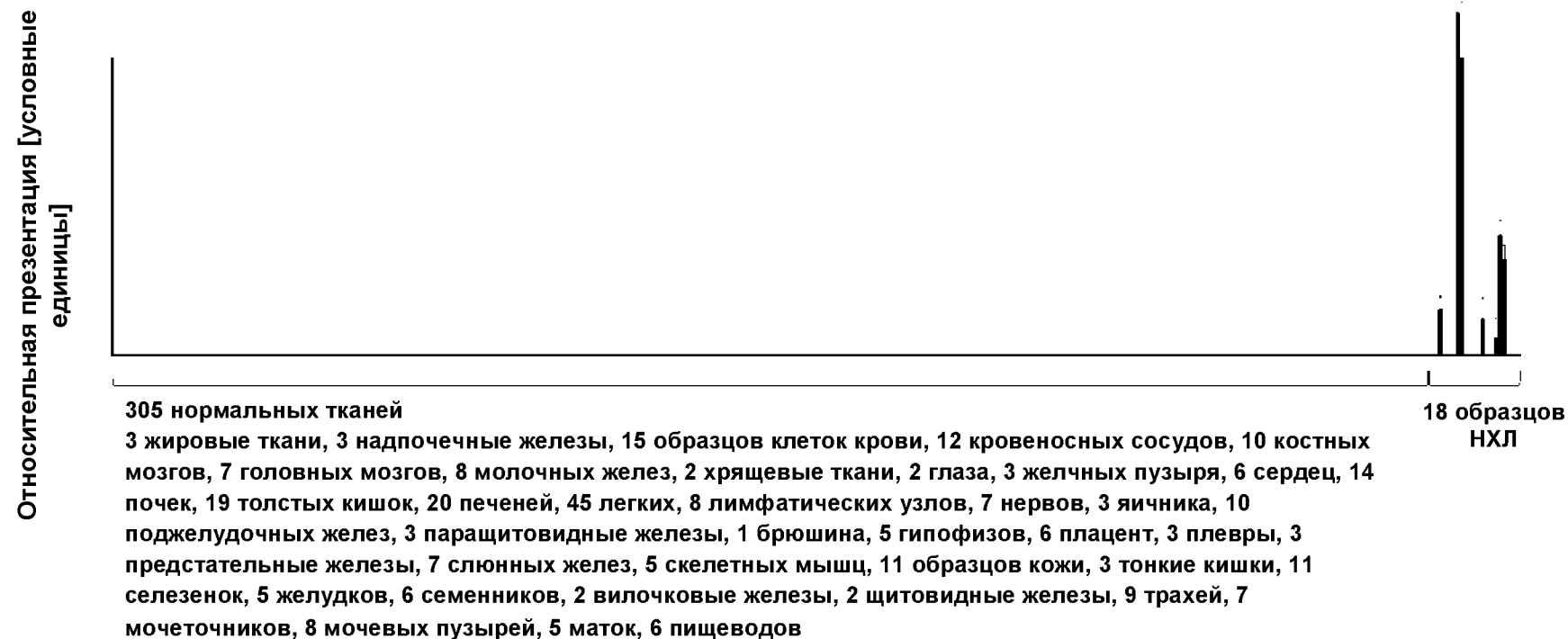
12. Применение пептида по любому из пп. 1–4, антитела по п.5, нуклеиновой кислоты или вектора экспрессии по п. 7, клетки по п. 8, или активированного Т-лимфоцита по п.11 в диагностике и/или лечении рака или в производстве лекарственного средства против рака.
13. Применение по п. 12, где указанный рак выбран из группы: НХЛ, немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, почечноклеточный рак, рак головного мозга, рак желудка, колоректальный рак, гепатоклеточный рак, рак поджелудочной железы, лейкоз, рак молочной железы, меланома, рак яичника, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря и желчных протоков и другие опухоли, которые демонстрируют избыточную экспрессию белка, из которого получен пептид с SEQ ID No. 120, и SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 112, и SEQ ID No. 114 по SEQ ID No. 119, и SEQ ID No. 121 по SEQ ID No. 311.
14. Набор, включающий:
 - (а) контейнер, включающий фармацевтическую композицию, содержащую пептид(ы) или вариант по любому из пп. 1–4, антитело по п.5, нуклеиновую(ые) кислоту(ы) или вектор(ы) экспрессии по п. 7, клетку(и) по п. 8, активированный(ые) Т-лимфоцит(ы) по п. 11 в виде раствора или в лиофилизированной форме;
 - (б) необязательно – второй контейнер, содержащий разбавитель или восстанавливающий раствор для лиофилизированного состава;
 - (в) необязательно – по меньшей мере еще один пептид, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 328, и
 - (г) необязательно – инструкции по (i) применению раствора или (ii) восстановлению и/или применению лиофилизированного состава.

15. Фармацевтическая композиция, включающая по меньшей мере один активный ингредиент, выбранный из группы, состоящей из
- а) пептида, выбранного из группы, состоящей из SEQ ID No. 120, и SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 112, и SEQ ID No. 114 по SEQ ID No. 119, и SEQ ID No. 121 по SEQ ID No. 311;
 - б) Т-клеточного рецептора, реагирующего с пептидом и/или комплексом пептида и МНС в соответствии с а);
 - в) слитого белка, включающего пептид в соответствии с а) и от 1 до 80 N-терминальных аминокислот антиген-ассоциированной инвариантной цепи HLA-DR (II);
 - г) нуклеиновой кислоты, кодирующей любой из ингредиентов с а) по в), или вектора экспрессии, включающего указанную нуклеиновую кислоту,
 - д) клетки-хозяина, включающей вектор экспрессии в соответствии с г),
 - е) активированного Т-лимфоцита, полученного способом, включающим контактирование Т-клеток *in vitro* с пептидом в соответствии с а), экспрессированным на поверхности подходящей антигенпрезентирующей клетки в течение периода времени, достаточного для активации антиген-специфическим образом указанной Т-клетки, а также способом переноса этих активированных Т-клеток в аутологичных или других пациентов;
 - ж) антитела или растворимого Т-клеточного рецептора, реагирующего с пептидом и/или комплексом пептида и МНС в соответствии с а) и/или клеткой, презентирющей пептид в соответствии с а), и потенциально модифицированной посредством слияния, например, с иммуноактивирующими доменами или токсинами,
 - з) аптамера, распознающего пептид, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID No. 120, и SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 112, и SEQ ID No. 114 по SEQ ID No. 119, и SEQ ID No. 121 по SEQ ID No. 311, и/или комплекс пептида, выбранного из группы, состоящей из SEQ ID No. 120, и SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 112, и SEQ ID No. 114 по SEQ ID No. 119, и SEQ ID No. 121 по SEQ ID No. 311, с молекулой МНС,
 - и) конъюгированного или меченого пептида или каркаса в соответствии с любым из пунктов а)–з)
- и фармацевтически приемлемый носитель и, необязательно, фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества и/или стабилизаторы.

Фигура 1А

Пептид: LLSGQLPTI (A*02)

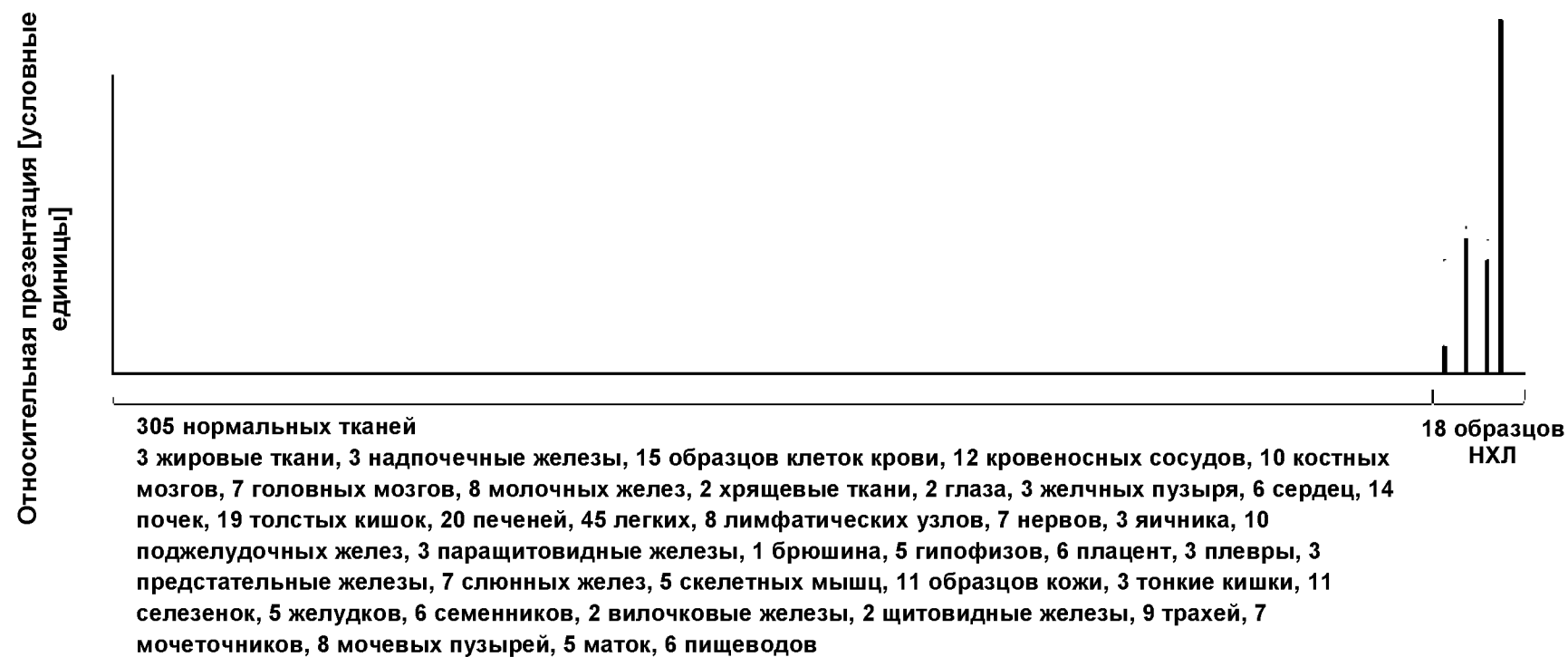
SEQ ID NO: 1



Фигура 1B

Пептид: VLQGLTFTL (A*02)

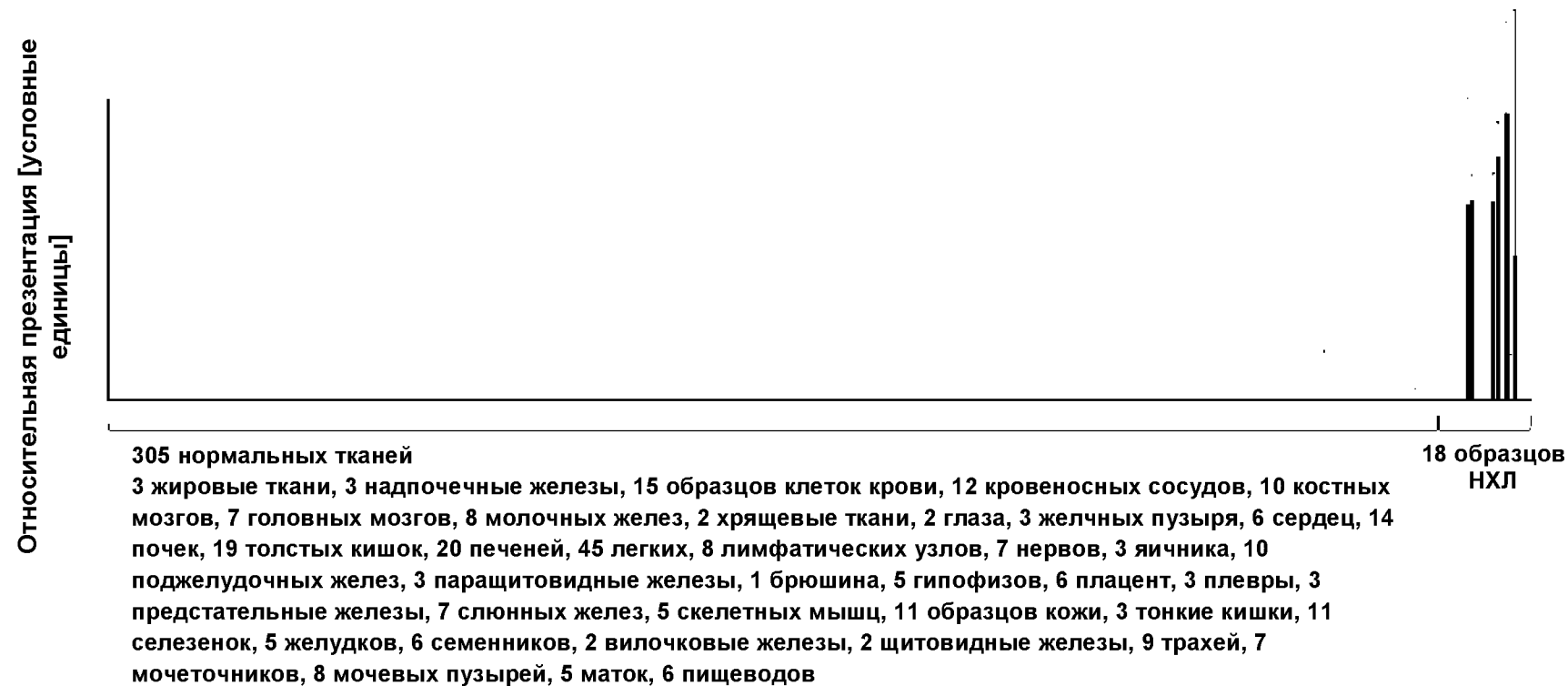
SEQ ID NO: 5



Фигура 1С

Пептид: ILASIFETV (A*02)

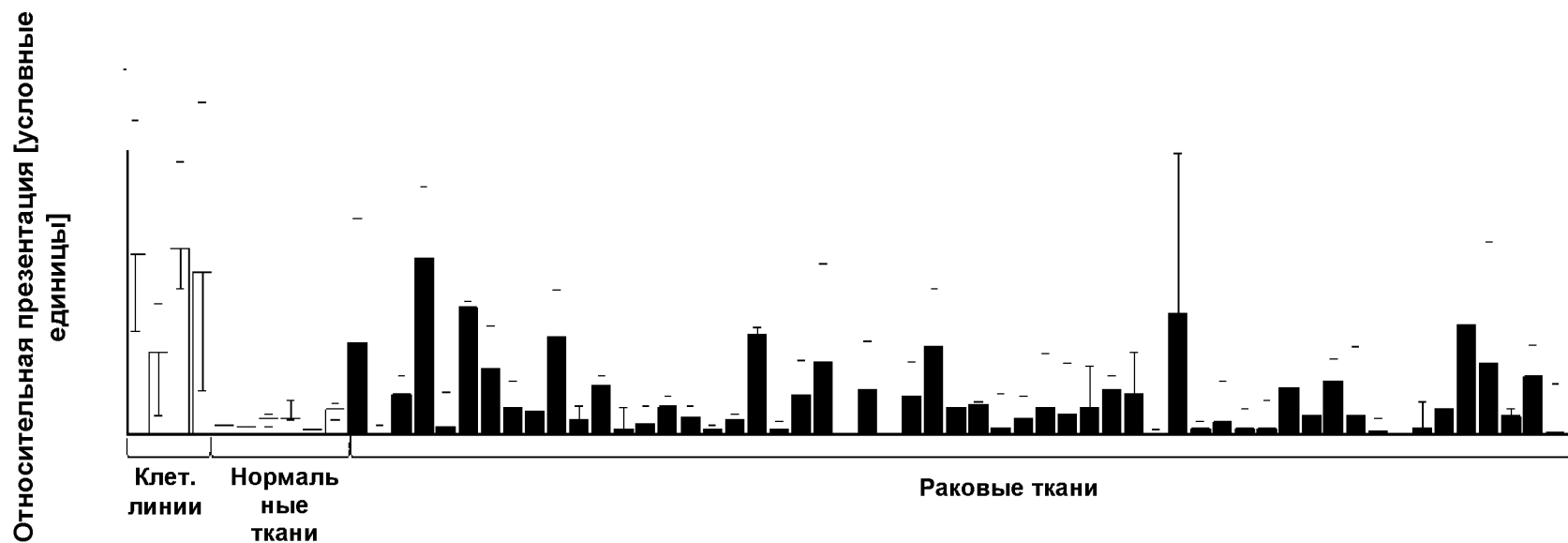
SEQ ID NO: 41



Фигура 1D

Пептид: NLLEQFILL (A*02)

SEQ ID NO: 248



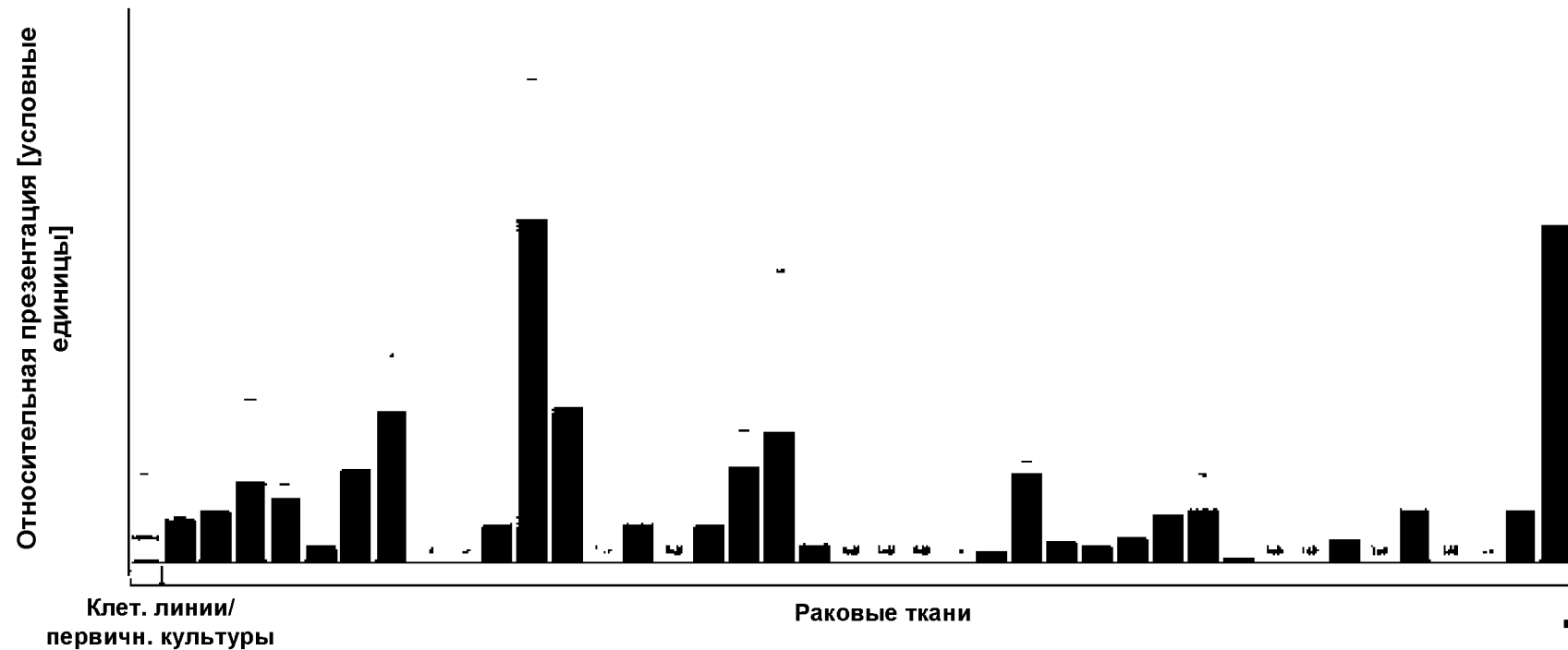
Пептид, выявленный на

4 клеточных линиях рака, 6 нормальных тканях (1 лимфатический узел, 3 селезенки, 1 желудок, 1 матка), 55 раковых тканях (2 рака головного мозга, 1 рак молочной железы, 1 рак слепой кишки, 6 раков толстой кишки, 6 лейкоцитарных лейкозов, 2 рака печени, 10 раков легких, 8 раков лимфатических узлов, 1 рак миелоидных клеток, 3 рака яичника, 1 рак предстательной железы, 1 рак прямой кишки, 4 рака кожи, 2 рака желудка, 3 рака мочевого пузыря, 4 рака матки) (слева направо)

Фигура 1Е

Пептид: LLSEETPSA (A*02)

SEQ ID NO: 2



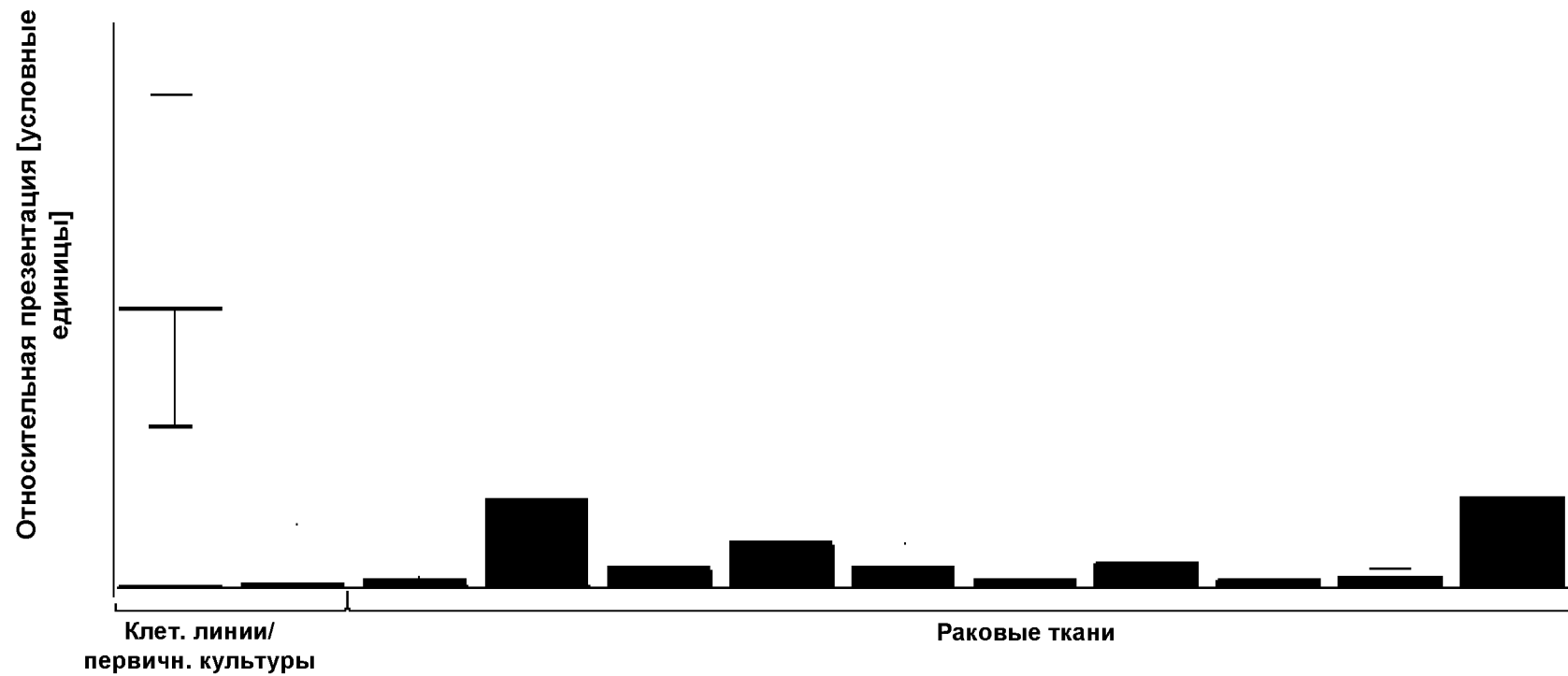
Пептид, выявленный на

1 первичной культуре, 40 раковых тканях (1 рак костного мозга, 1 рак головного мозга, 2 рака молочной железы, 8 раков головы и шеи, 4 лейкоцитарных лейкоза, 1 рак печени, 7 раков легких, 6 раков лимфатических узлов, 2 рака миелоидных клеток, 1 рак яичника, 3 рака кожи, 3 рака мочевого пузыря, 1 рак матки) (слева направо)

Фигура 1F

Пептид: FLLVGTQIDL (A*02)

SEQ ID NO: 10



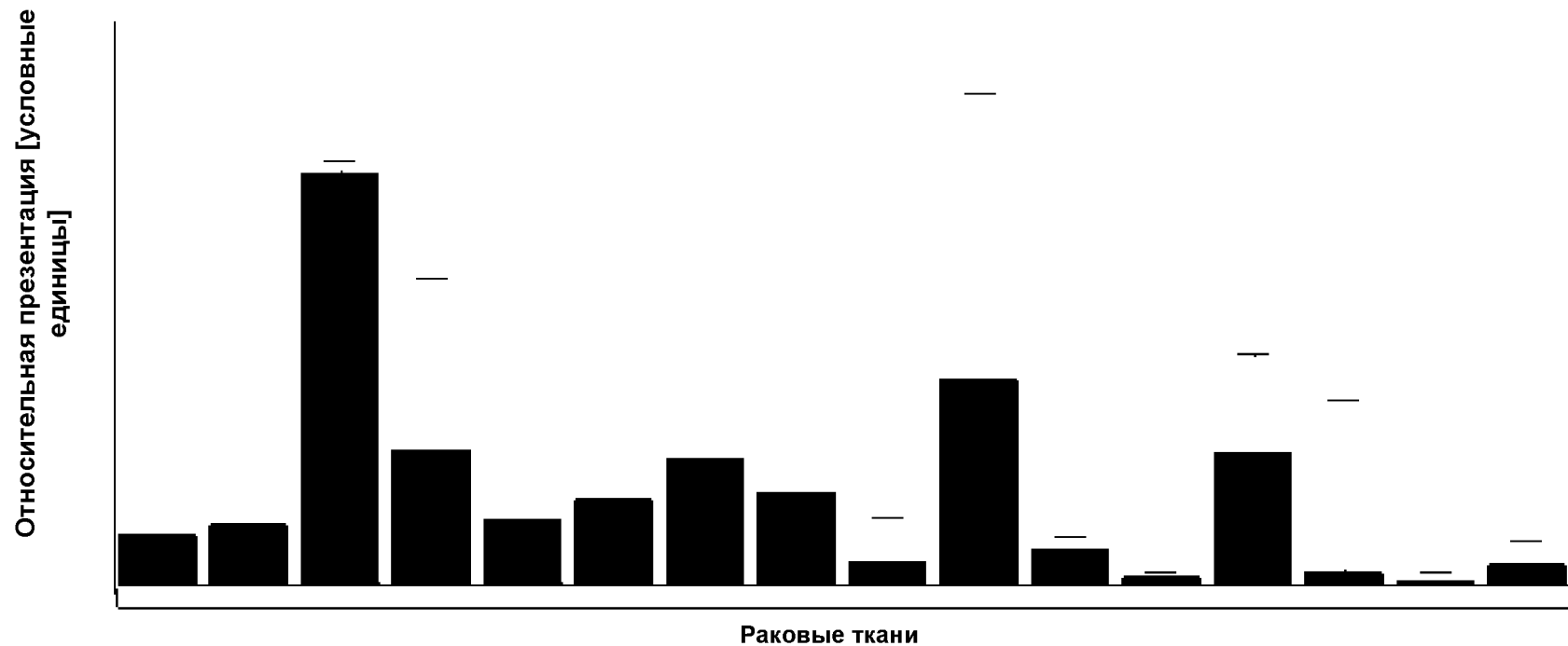
Пептид, выявленный на

2 клеточных линиях, 10 раковых тканях (2 рака молочной железы, 1 рак головы и шеи, 1 лейкоцитарный лейкоз, 1 рак легких, 4 рака лимфатических узлов, 1 рак матки) (слева направо)

Фигура 1G

Пептид: GLLLLVPLL (A*02)

SEQ ID NO: 12

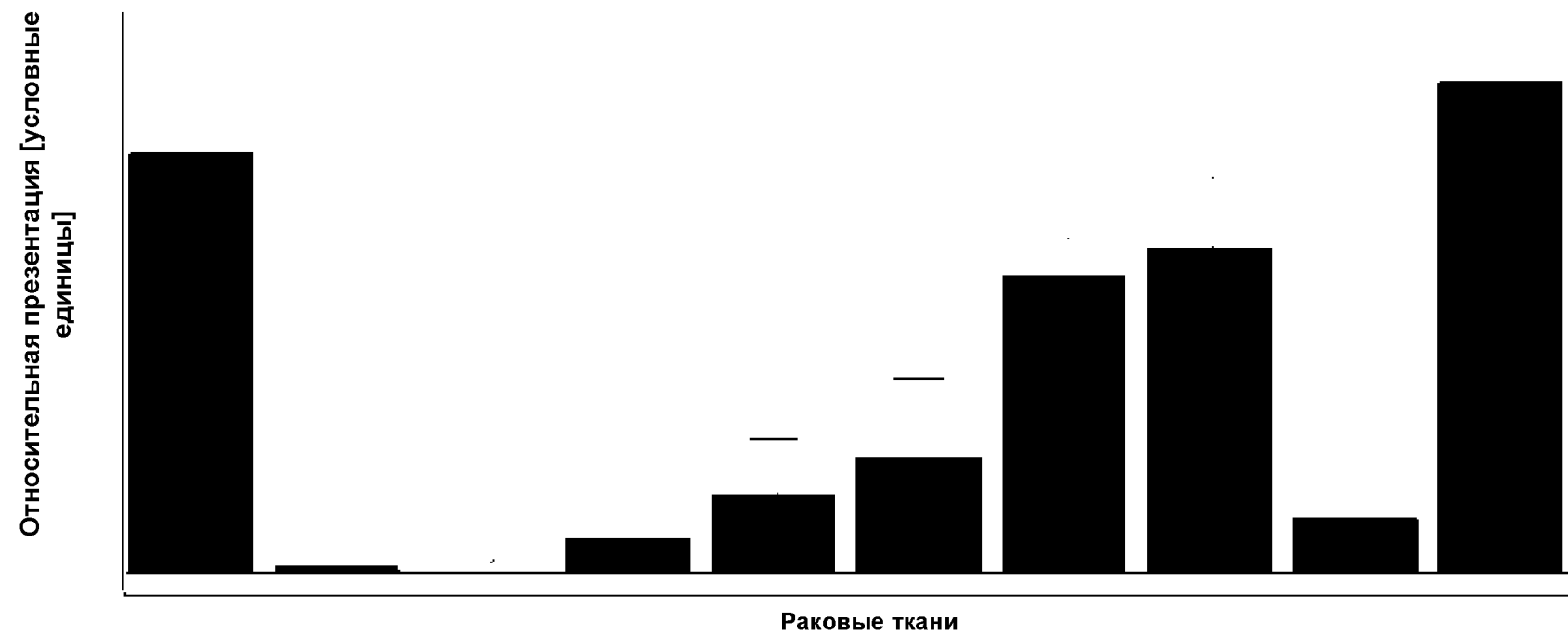


Пептид, выявленный на

16 раковых тканях (1 рак молочной железы, 1 рак толстой кишки, 1 колоректальный рак, 1 рак пищевода, 1 рак желчного пузыря, 1 рак головы и шеи, 2 рака легких, 5 раков лимфатических узлов, 2 рака яичника, 1 рак кожи) (слева направо)

Фигура 1Н

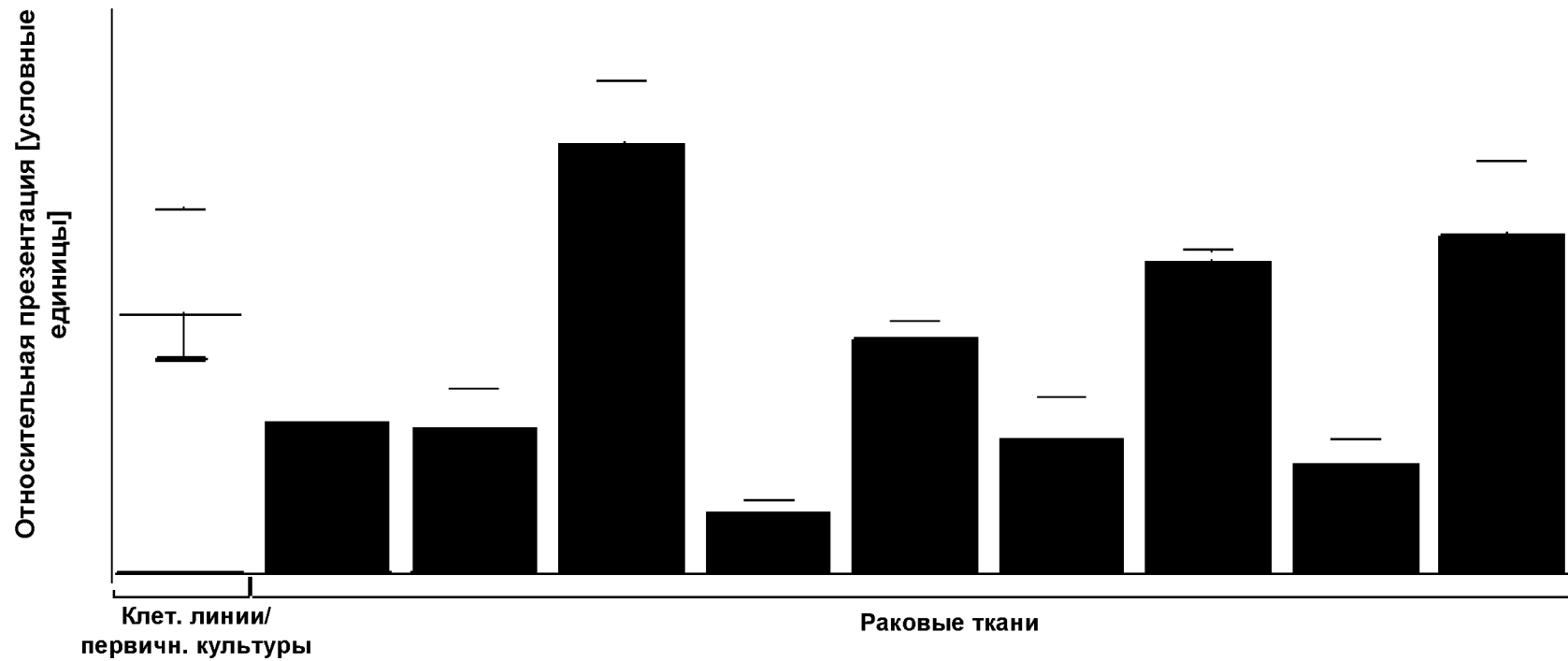
Пептид: HLPASWKL (A*02)
SEQ ID NO: 13



Пептид, выявленный на
10 раковых тканях (1 лейкоцитарный лейкоз, 1 рак легких, 5 раков лимфатических узлов, 1 рак яичника, 1 рак кожи, 1 рак яичка) (слева направо)

Фигура 11

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

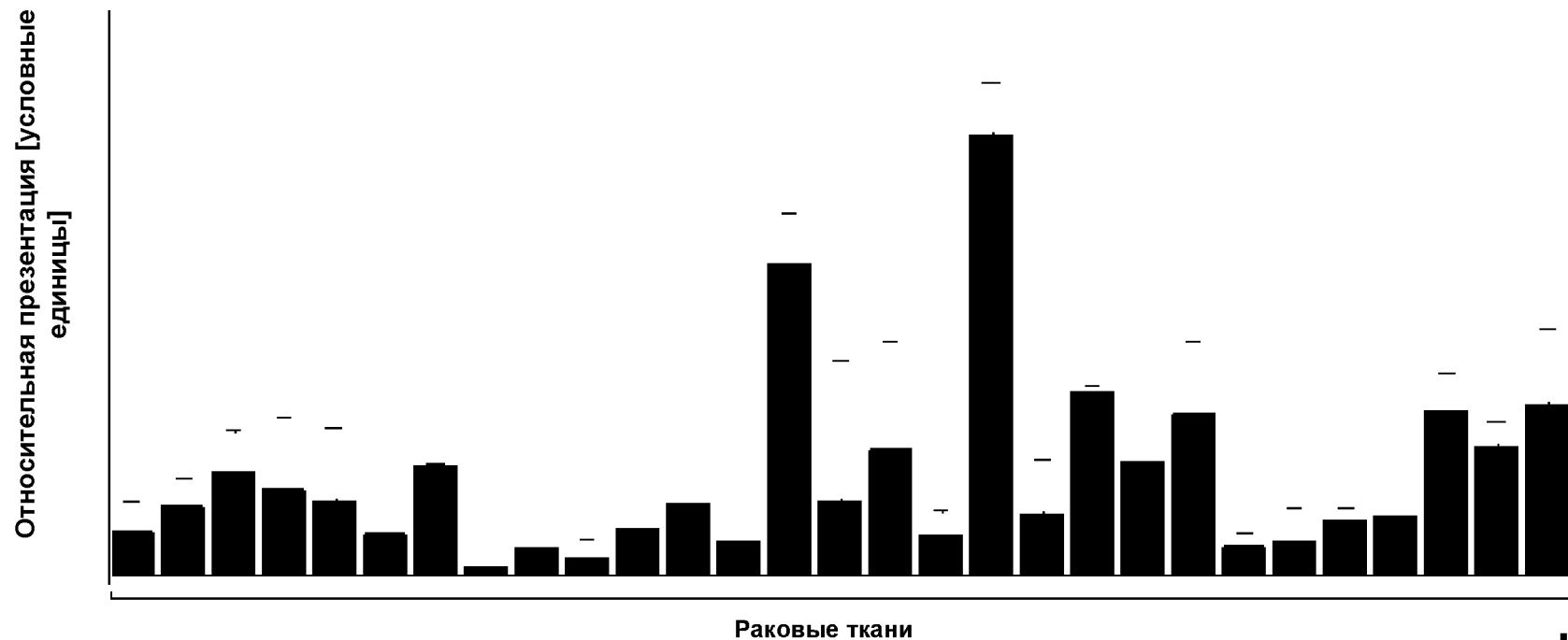


Пептид, выявленный на
1 клеточной линии, 9 раковых тканях (1 рак головного мозга, 1 рак легких, 1 рак лимфатических узлов, 1 рак миелоидных клеток, 2 рака яичника, 2 рака кожи, 1 рак матки) (слева направо)

Фигура 1J

Пептид: ILSTLDVEL (A*02)

SEQ ID NO: 30



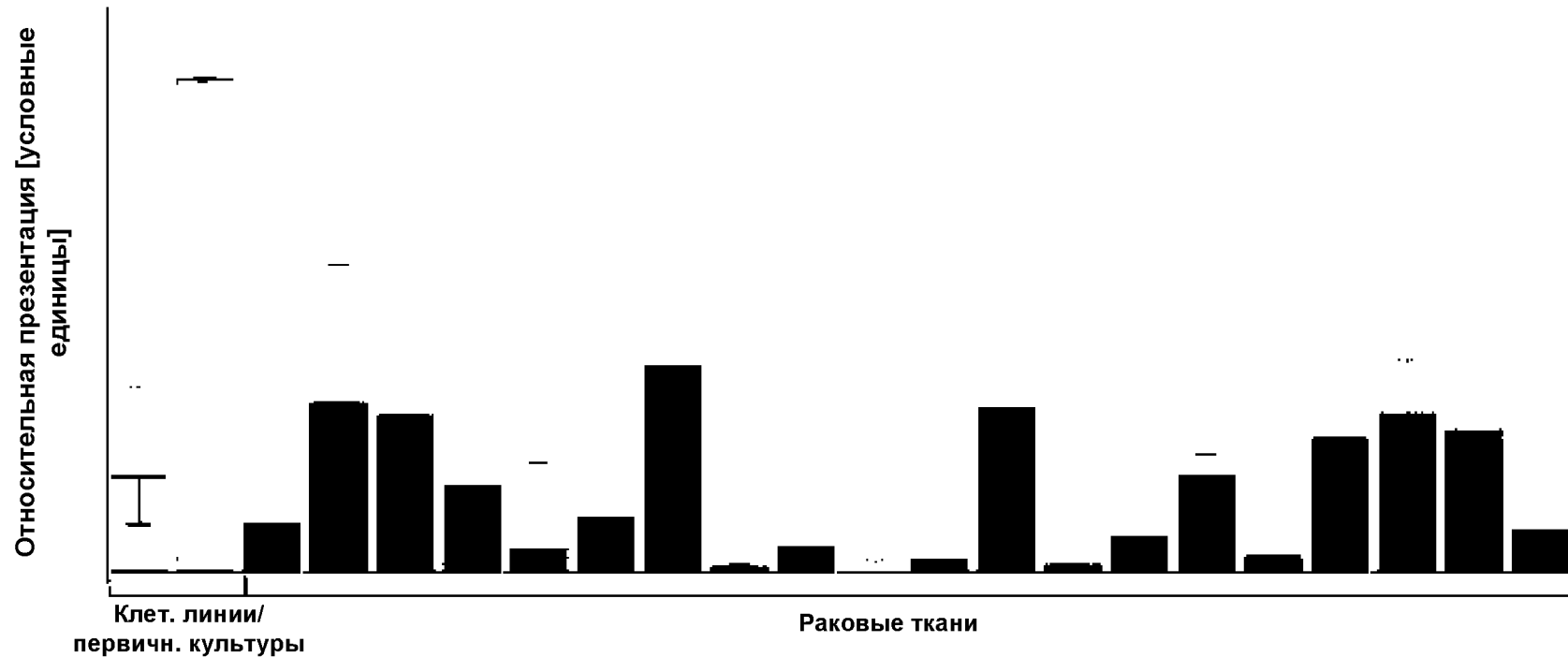
Пептид, выявленный на

29 раковых тканях (1 рак костного мозга, 2 рака толстой кишки, 1 рак желчного пузыря, 3 рака головы и шеи, 1 рак почки, 5 раков легких, 7 раков лимфатических узлов, 1 рак яичника, 5 раков кожи, 2 рака мочевого пузыря, 1 рак матки) (слева направо)

Фигура 1К

Пептид: VILDIPLLLET (A*02)

SEQ ID NO: 36



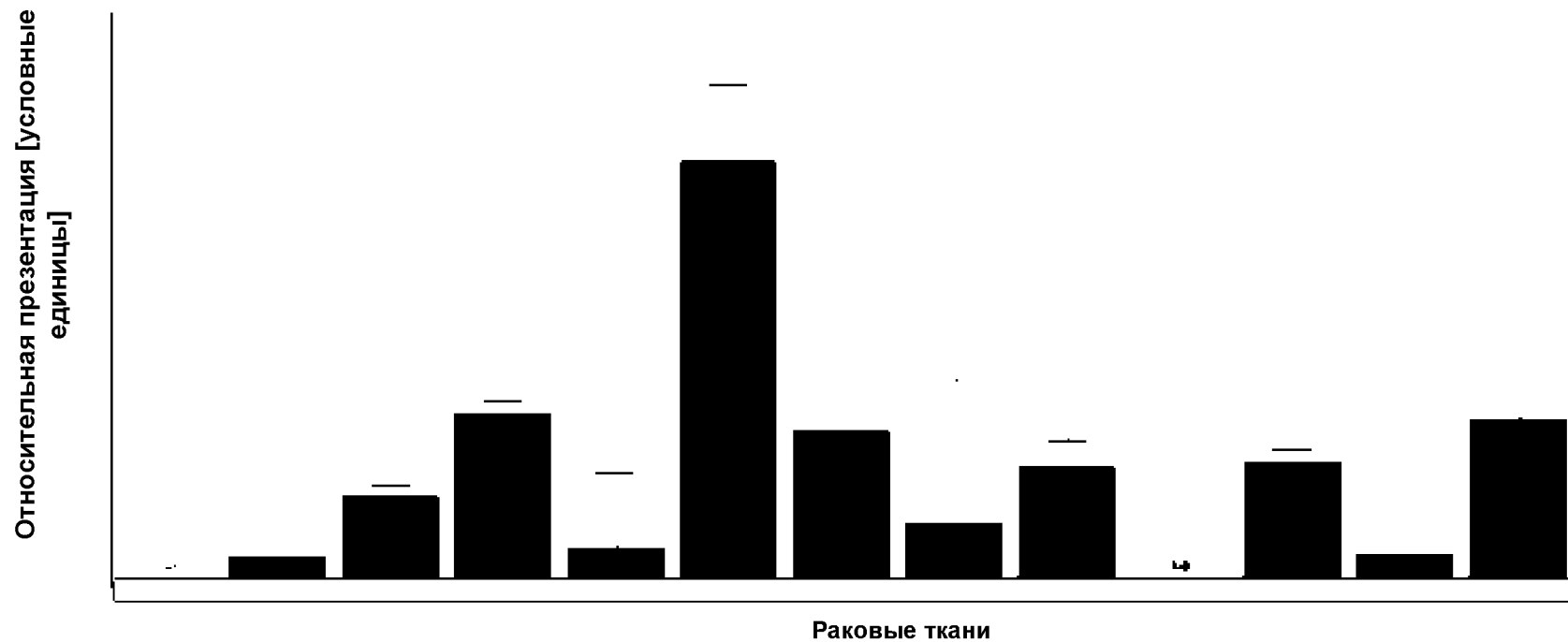
Пептид, выявленный на

2 клеточных линиях, 20 раковых тканях (1 рак головного мозга, 1 рак молочной железы, 1 колоректальный рак, 1 рак головы и шеи, 1 лейкоцитарный лейкоз, 1 рак печени, 3 рака легких, 4 рака лимфатических узлов, 1 рак миелоидных клеток, 1 рак яичника, 4 рака кожи, 1 рак матки) (слева направо)

Фигура 1L

Пептид: ALLEGVKNV (A*02)

SEQ ID NO: 43



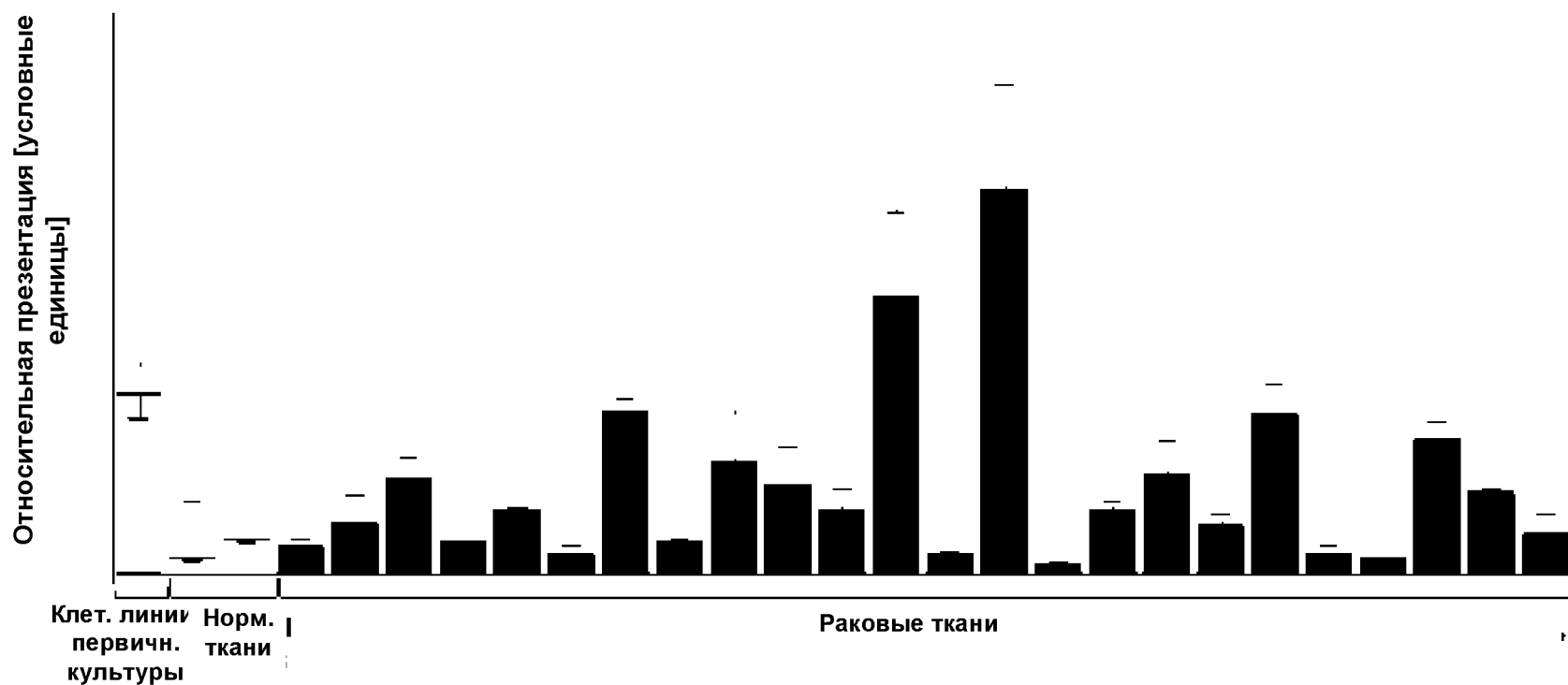
Пептид, выявленный на

13 раковых тканях (1 рак молочной железы, 1 лейкоцитарный лейкоз, 1 рак легких, 6 раков лимфатических узлов, 3 рака яичника, 1 рак прямой кишки) (слева направо)

Фигура 1М

Пептид: SLDLRPLEV (A*02)

SEQ ID NO: 74



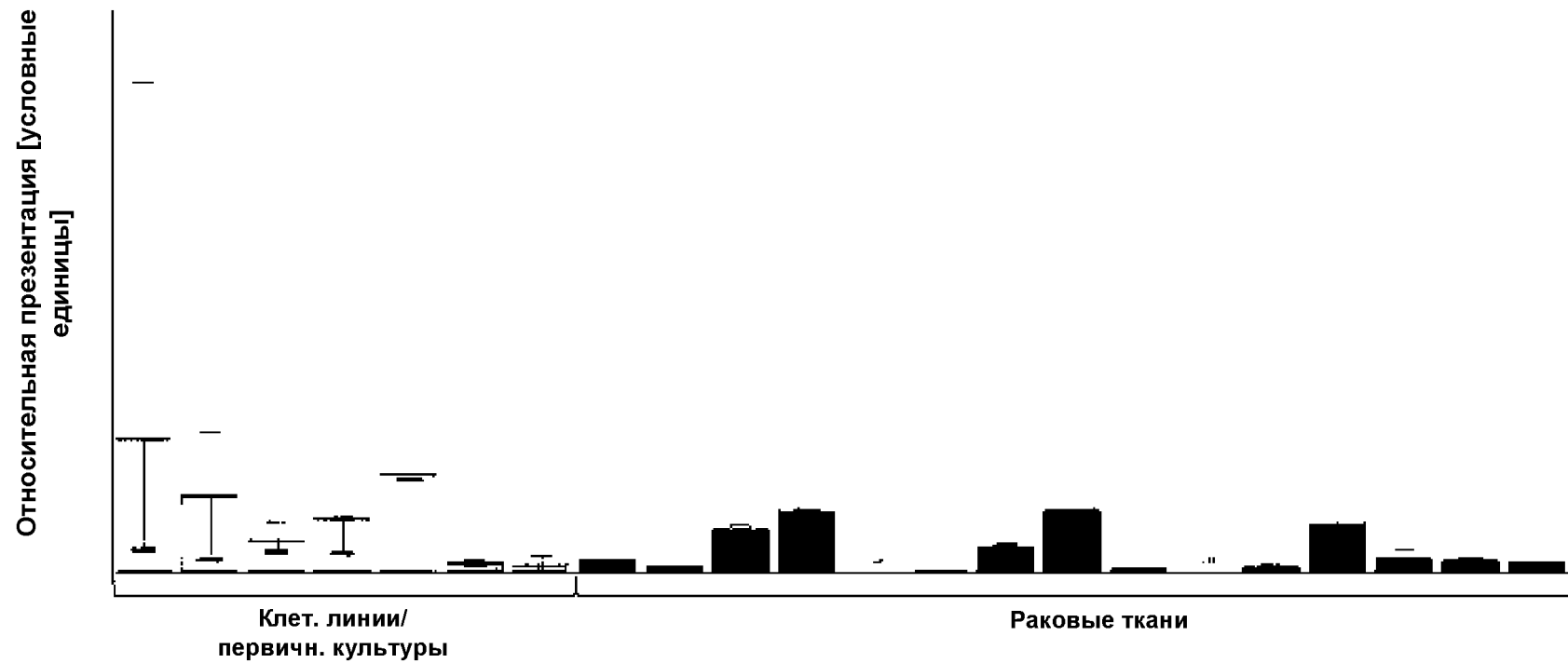
Пептид, выявленный на

1 клеточной линии, 2 нормальных тканях (1 лимфатический узел, 1 селезенка), 24 раковых тканях (3 рака головного мозга, 1 рак толстой кишки, 1 рак желчного пузыря, 1 рак почки, 1 рак легких, 12 раков лимфатических узлов, 1 рак яичника, 1 рак кожи, 2 рака желудка, 1 рак яичка) (слева направо)

Фигура 1N

Пептид: FLYSETWNI (A*02)

SEQ ID NO: 254



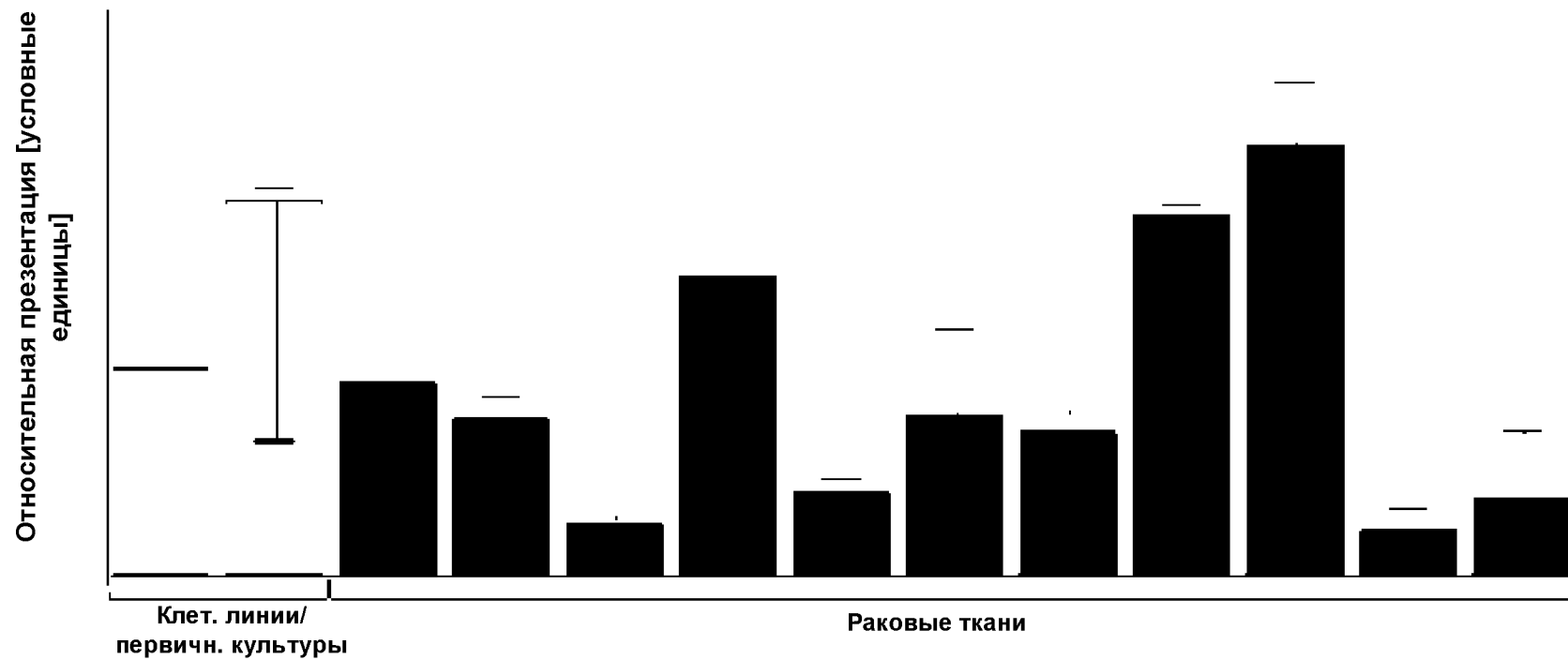
Пептид, выявленный на

7 клеточных линиях, 15 раковых тканях (1 рак толстой кишки, 2 рака головы и шеи, 3 лейкоцитарных лейкоза, 1 рак печени, 6 раков лимфатических узлов, 1 рак миелоидных клеток, 1 рак кожи) (слева направо)

Фигура 10

Пептид: FLQEWVYA (A*02)

SEQ ID NO: 257



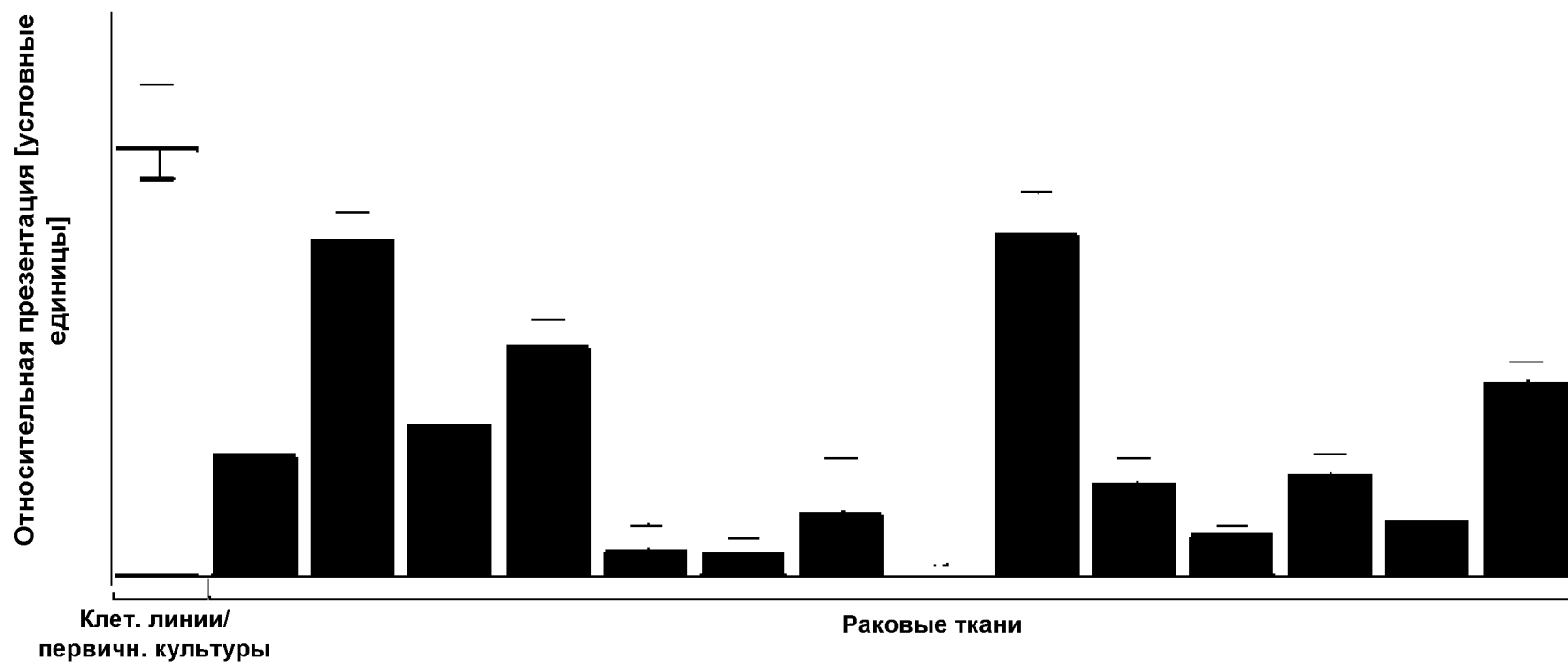
Пептид, выявленный на

2 клеточных линиях, 11 раковых тканях (2 лейкоцитарных лейкоза, 1 рак печени, 4 рака лимфатических узлов, 1 рак миелоидных клеток, 2 рака кожи, 1 рак мочевого пузыря) (слева направо)

Фигура 1Р

Пептид: TVLDGLEFKV (A*02)

SEQ ID NO: 259



Пептид, выявленный на

1 первичной культуре, 14 раковых тканях (1 рак головы и шеи, 3 лейкоцитарных лейкоза, 3 рака легких, 3 рака лимфатических узлов, 1 рак миелоидных клеток, 1 рак яичника, 2 рака кожи) (слева направо)

Фигура 2А

Ген: MIXL1
(Пептид: LLPPPSРАА, SEQ ID NO: 160)

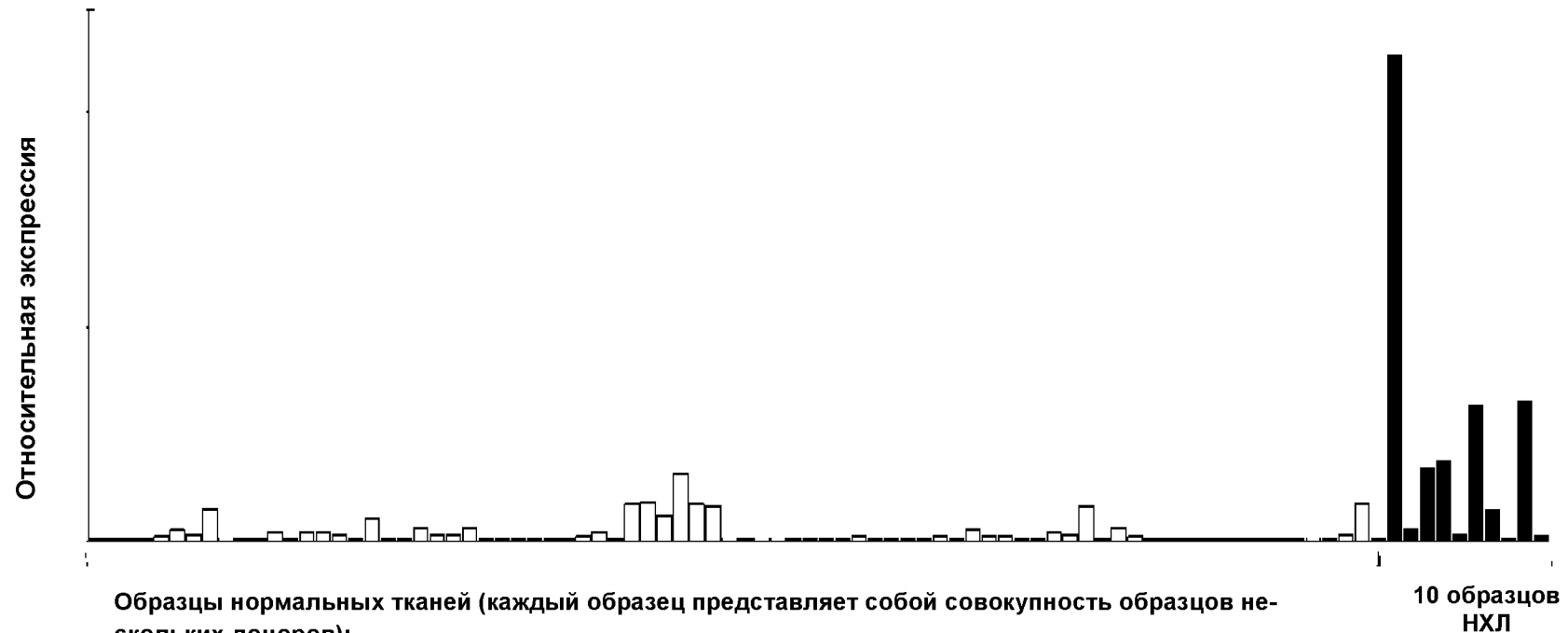


Образцы нормальных тканей (каждый образец представляет собой совокупность образцов нескольких доноров):

6 артерий, 2 образца клеток крови, 2 головных мозга, 1 сердце, 2 печени, 3 легких, 2 вены, 1 жировая ткань, 1 надпочечная железа, 5 костных мозгов, 1 хрящевая ткань, 1 толстая кишка, 1 пищевод, 2 глаза, 2 желчных пузыря, 1 почка, 6 лимфатических узлов, 4 поджелудочные железы, 2 периферических нерва, 2 гипофиза, 1 прямая кишка, 2 слюнные железы, 2 скелетные мышцы, 1 кожа, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 щитовидная железа, 7 трахей, 1 мочевого пузыря, 1 молочная железа, 5 яичников, 5 плацент, 1 предстательная железа, 1 семенник, 1 вилочковая железа, 1 матка (слева направо)

Фигура 2В

Ген: CCR4
(Пептид: SLNSTTWKV, SEQ ID NO: 199)

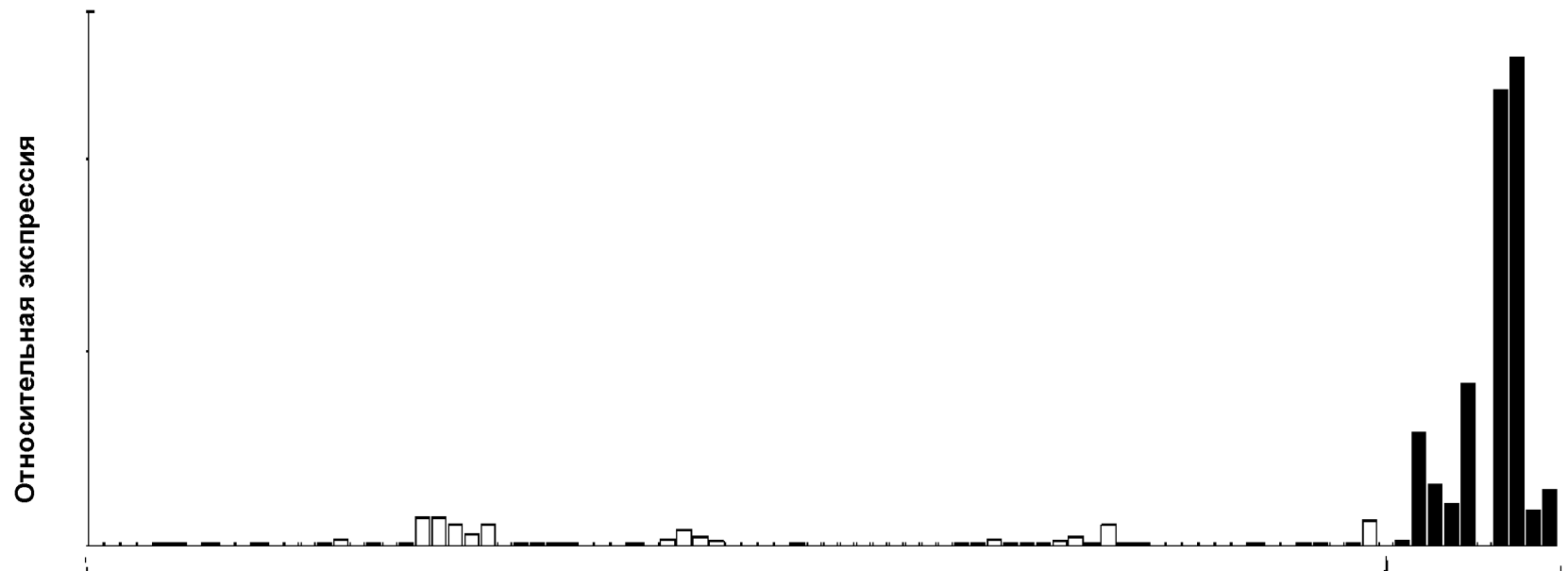


Образцы нормальных тканей (каждый образец представляет собой совокупность образцов нескольких доноров):

6 артерий, 2 образца клеток крови, 2 головных мозга, 1 сердце, 2 печени, 3 легких, 2 вены, 1 жировая ткань, 1 надпочечная железа, 5 костных мозгов, 1 хрящевая ткань, 1 толстая кишка, 1 пищевод, 2 глаза, 2 желчных пузыря, 1 почка, 6 лимфатических узлов, 4 поджелудочные железы, 2 периферических нерва, 2 гипофиза, 1 прямая кишка, 2 слюнные железы, 2 скелетные мышцы, 1 кожа, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 щитовидная железа, 7 трахей, 1 мочевого пузыря, 1 молочная железа, 5 яичников, 5 плацент, 1 предстательная железа, 1 семенник, 1 вилочковая железа, 1 матка (слева направо)

Фигура 2С

Ген: HIST1H1B
(Пептид: ALAAGGYDV, SEQ ID NO: 202)

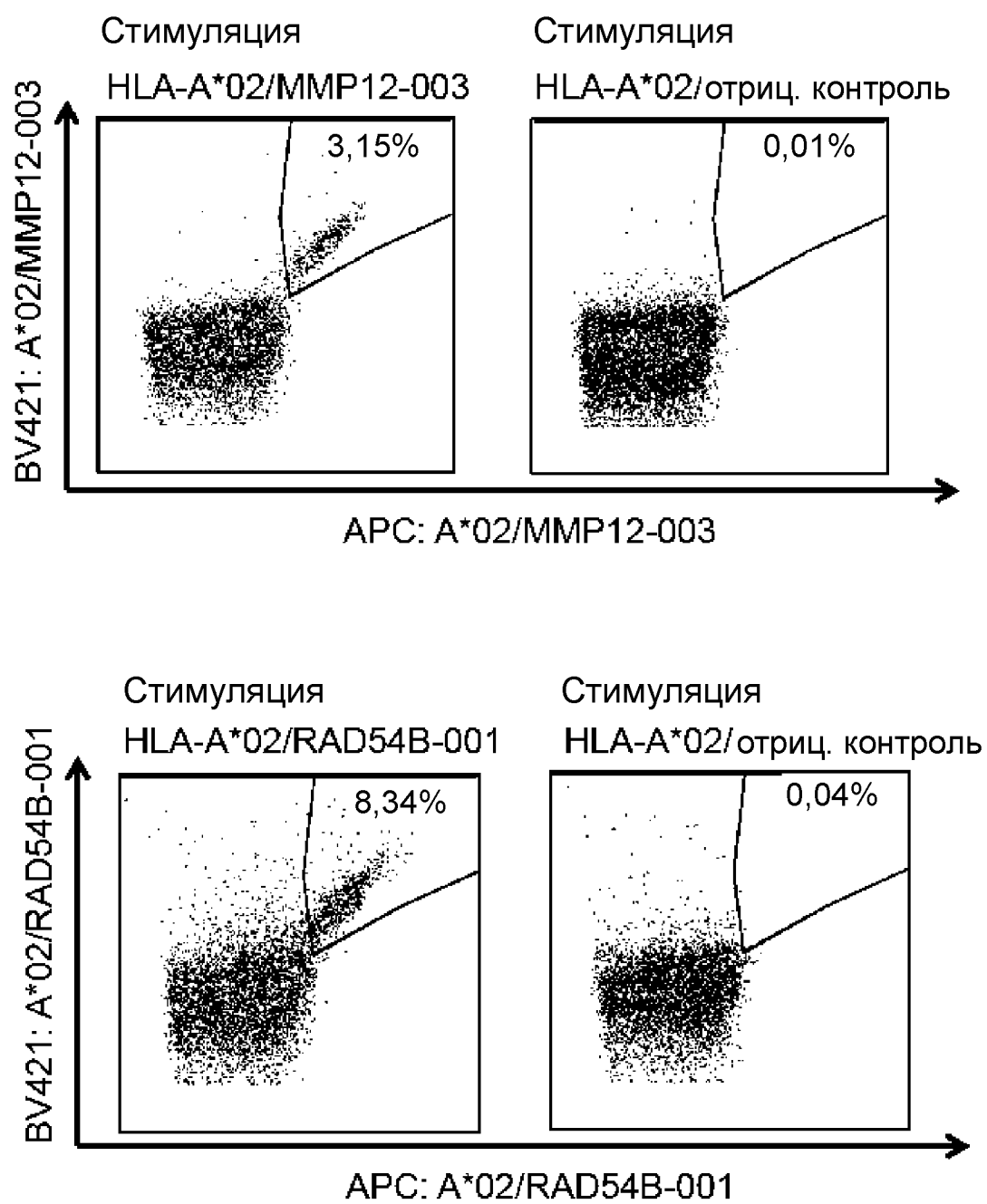


Образцы нормальных тканей (каждый образец представляет собой совокупность образцов нескольких доноров):

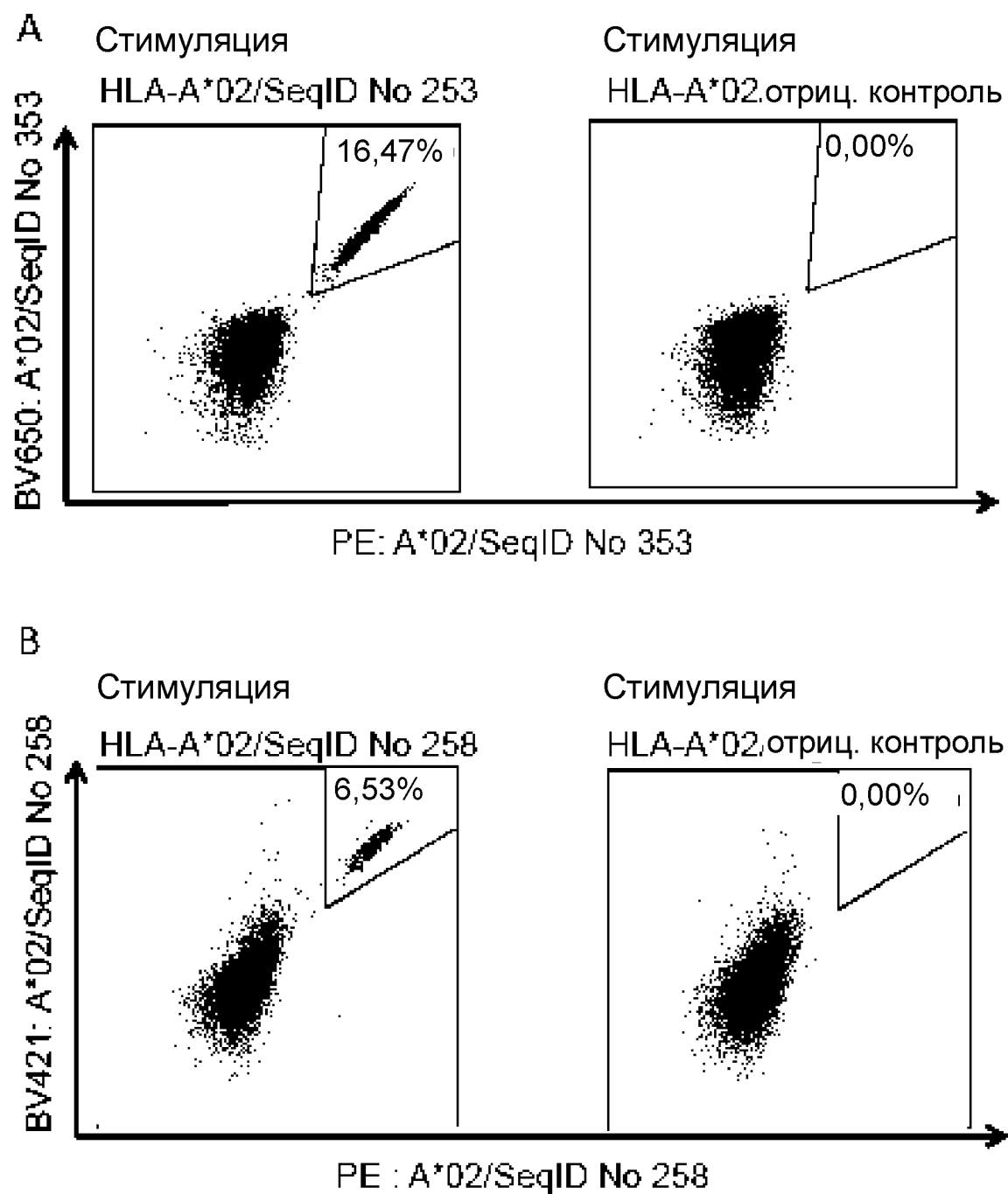
6 артерий, 2 образца клеток крови, 2 головных мозга, 1 сердце, 2 печени, 3 легких, 2 вены, 1 жировая ткань, 1 надпочечная железа, 5 костных мозгов, 1 хрящевая ткань, 1 толстая кишка, 1 пищевод, 2 глаза, 2 желчных пузыря, 1 почка, 6 лимфатических узлов, 4 поджелудочные железы, 2 периферических нерва, 2 гипофиза, 1 прямая кишка, 2 слюнные железы, 2 скелетные мышцы, 1 кожа, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 щитовидная железа, 7 трахей, 1 мочевого пузыря, 1 молочная железа, 5 яичников, 5 плацент, 1 предстательная железа, 1 семенник, 1 вилочковая железа, 1 матка (слева направо)

10 образцов
НХЛ

Фигура 3



Фигура 4



Фигура 4 (продолжение)

