

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190587** (13) **A2**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.06.30

(22) Дата подачи заявки
2015.12.16

(51) Int. Cl. *A61K 38/04* (2006.01)
C07K 7/00 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) НОВЫЕ ПЕПТИДЫ И КОМБИНАЦИИ ПЕПТИДОВ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ИММУНОТЕРАПИИ ГЕПАТОКЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЫ (ГКК) И ДРУГИХ ВИДОВ РАКА

(31) 1423016.3; 62/096,165; 1501017.6

(32) 2014.12.23; 2014.12.23; 2015.01.21

(33) GB; US; GB

(62) 201791150; 2015.12.16

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

(72) Изобретатель:
**Вайншенк Тони, Мар Андреа,
Фритше Йенс, Мюллер Филип, Вибе
Анита, Кутчер Сара (DE)**

(74) Представитель:
**Парамонова К.В., Угрюмов В.М.,
Христофоров А.А., Гизатуллина
Е.М., Строкова О.В., Лебедев В.В.,
Костюшенкова М.Ю., Гизатуллин
Ш.Ф. (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 последующим 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. В частности, настоящее изобретение относится к нескольким новым пептидным последовательностям и их вариантам, образованным из молекул HLA I и II классов 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.

A2

202190587

202190587

A2

НОВЫЕ ПЕПТИДЫ И КОМБИНАЦИИ ПЕПТИДОВ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ИММУНОТЕРАПИИ ГЕПАТОКЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЫ (ГКК) 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 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 последующим 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. В частности, настоящее изобретение относится к нескольким новым пептидным последовательностям и их вариантам, образованным из молекул HLA I и II классов 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

Гепатоклеточная карцинома (ГКК) является одной из самых распространенных форм рака в мире, и на ее долю приходится около 6% всех новых случаев заболевания раком, диагностируемых в мире. В 2012 г. в мире было выявлено около 782 000 новых случаев заболевания ГКК. Таким образом, это заболевание занимает пятое место среди наиболее распространенных раковых заболеваний у мужчин (554 000 случаев) и девятое место у женщин (228 000 случаев)

(<http://globocan.iarc.fr>). ГКК является наиболее распространенным первичным злокачественным заболеванием печени, на долю которого приходится свыше 80% всех случаев первичных раковых заболеваний печени у взрослого населения.

Имеются географические различия распространения ГКК, и частота заболеваемости зависит от пола пациента. Наиболее высокий стандартизованный по возрасту (ASR) коэффициент заболеваемости ГКК мужчин установлен в Восточной Азии (31,9) и Юго-Восточной Азии (22,2), средний – в Южной Европе (9,5) и Северной Америке (9,3) и наиболее низкий – в Северной Европе (4,6) и Южной и Центральной Азии (3,7). Частота заболеваемости ГКК женщин ниже, чем коэффициенты заболеваемости мужчин. Наиболее высокий стандартизованный по возрасту коэффициент заболеваемости женщин установлен в Восточной Азии (10,2) и Западной Африке (8,1), наиболее низкий – в Северной Европе (1,9) и Микронезии (1,6).

В целом, прогноз для больных ГКК неутешителен. Показатель относительной 5-летней выживаемости (5Y-RSR) при ГКК составляет около 15%, в зависимости от стадии, на которой был поставлен диагноз. В случае локализованной ГКК, когда раковый очаг ограничен печенью, показатель 5Y-RSR составляет около 28%. В случае местного и отдаленного распространения ГКК, когда раковое заболевание поразило прилегающие или отдаленные органы, уровень 5Y-RSR составляет 7% и 2%, соответственно.

Возникновение ГКК связано с несколькими факторами риска, при чем цирроз является одним из наиболее важных. Зачастую к циррозу приводит злоупотребление алкоголем или инфекции вируса гепатита В или С, однако он может быть также вызван метаболическими заболеваниями, такими как сахарный диабет II типа. В результате здоровая ткань печени заменяется рубцовой тканью, что повышает риск развития ракового заболевания.

Лечение пациентов с заболеванием зависит от стадии опухоли в момент постановки диагноза и общего состояния печени. Если возможно, то с помощью хирургической операции удаляют части печени (частичная гепатэктомия) или весь орган целиком (резекция печени). Особенно подходящими для получения трансплантата печени являются пациенты с малыми или полностью резектабельными опухолями.

Если хирургическая операция не является возможным вариантом лечения, то в распоряжении имеются различные другие виды терапии. В целях абляции опухоли в печень вводят зонд, и опухоль разрушается с помощью радиоволн или микроволнового воздействия или криотерапии. При процедуре эмболизации с помощью механических или химических средств блокируют поступление крови в опухоль. Высокоинтенсивные радиоволны могут использоваться для разрушения опухоли в рамках лучевой терапии.

Химиотерапия против ГКК включает комбинации из доксорубина, 5-фторурацила и цисплатина для системной терапии и доксорубина, флоксуридина и митомицина С для инфузии в печеночную артерию. Однако большинство ГКК обладают высокой резистентностью к химиотерапевтическим средствам (Enguita-German and Fortes, 2014).

Варианты лечения при распространенной нерезектабельной ГКК ограничены применением сорафениба, мультитирозинкиназного ингибитора (Chang et al., 2007; Wilhelm et al., 2004). Сорафениб является единственным препаратом системного действия, который, как было подтверждено, увеличивает выживаемость примерно на 3 месяца, и на сегодняшний день представляется собой единственный экспериментальный вариант лечения для таких пациентов (Chapiro et al., 2014; Llovet et al., 2008).

В последнее время было проведено небольшое число клинических исследований применения иммунотерапии при лечении ГКК. Для активации субпопуляций

иммунных клеток и(или) повышения иммуногенности опухоли использовали цитокины (Reinisch et al., 2002; Sangro et al., 2004). Другие клинические исследования были сфокусированы на инфузии опухоль-инфильтрующих лимфоцитов или активированных лимфоцитов периферической крови (Shi et al., 2004a; Takayama et al., 1991; Takayama et al., 2000).

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

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: 300, или его варианту, который по меньшей мере на 80%, предпочтительно, по меньшей мере на 90% гомологичен (предпочтительно, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% идентичен) последовательности с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 300, 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 300, или его варианту, который по меньшей мере на 80%, предпочтительно, по меньшей мере на 88% гомологичен

(предпочтительно, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 88% идентичен) последовательности с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO 300, 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, представленные в Таблице 1, связываются с аллелями HLA A*02, пептиды из Таблицы 2 связываются с аллелями HLA-A*24. Пептиды из Таблицы 3 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. Они связываются с аллелем HLA-A*02. Пептиды из Таблицы 4 являются дополнительными пептидами, которые могут быть полезны в комбинации с другими пептидами по изобретению. Пептиды связываются с A*02 или, где указано, с A*24. Пептиды из Таблицы 5 далее полезны для постановки диагноза и(или) лечения различных злокачественных заболеваний, которые включают избыточную экспрессию или избыточную презентацию соответствующего базового полипептида.

Таблица 1: Пептиды HLA-A*02 в соответствии с настоящим изобретением - S* = фосфосерин

SEQ ID No.	Последовательность	Идент. номер(а) гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
1	VMAPFTMTI	338	APOB
2	KLQAGTVFV	10840	ALDH1L1
3	ILDDNMQKL	79611	ACSS3
4	KLQDFSDQL	338	APOB
5	ALVEQGFTV	338	APOB
6	KLSPTVVGL	8313	AXIN2
7	ALVDTLKFV	338	APOB
8	KLLEEATISV	54808	DYM
9	ALANQKLYSV	23195	MDN1

SEQ ID No.	Последовательность	Идент. номер(а) гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
10	SLLEEFDFHV	8615	USO1
11	SLSQELVGV	24149	ZNF318
12	FLAELAYDL	2719	GPC3
13	GLIDTETAMKAV	3290	HSD11B1
14	ALADLTGTVV	23385	NCSTN
15	LLYGHTVTV	347734	SLC35B2
16	SLLGGNIRL	2181	ACSL3
17	RVAS*PTSGV	8660	IRS2
18	ALYGKTEVV	57513	CASKIN2
19	FLEETKATV	338	APOB
20	KLSNVLQQV	338	APOB
21	QLIEVSSPITL	338	APOB
22	RIAGIRGIQGV	23167	EFR3A
23	RLYDPASGTISL	23456	ABCB10
24	SLAEEKLQASV	2194	FASN
25	SLDGKAAATEL	338	APOB
26	SLLHTIYEV	85407	NKD1
27	TLPDFRLPEI	338	APOB
28	TLQDHLNSL	338	APOB
29	YIQDEINTI	338	APOB
30	YLGEGRMV	5704	PSMC4
31	YQMDIQQEL	338	APOB
32	ALNAVRLLV	9368	SLC9A3R1
33	LLHGHIVEL	57678	GPAM
34	SLAEGTATV	540	ATP7B
35	SLQESILAQV	23644	EDC4
36	ILNVDGLIGV	47	ACLY
37	LLLPLPPLSP	347252	IGFBPL1
38	ALADVVEHA	26873	OPLAH
39	ALDPKANFST	10188	TNK2
40	ALLAEGITWV	54499	TMCO1
41	ALLELDEPLVL	2158	F9
42	ALLGGNVRMML	2182	ACSL4
43	ALLGVWTSV	444	ASPH
44	ALQDAIRQL	51268	PIPOX
45	ALQDQLVLV	183	AGT
46	AMAEMKVVL	11283, 4051, 57834, 66002, 8529	CYP4F8,CYP4F3,CYP4F11, CYP4F12,CYP4F2
47	FLDTPIAKV	85407	NKD1

SEQ ID No.	Последовательность	Идент. номер(а) гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
48	FLLEQPEIQV	5345	SERPINF2
49	FLYPEKDEPT	338	APOB
50	FTIPKLYQL	338	APOB
51	GLAEELVRA	5091	PC
52	GLFNAELLEA	3929	LBP
53	GLIHLEGDTV	81494	CFHR5
54	GLLDPNVKSIFV	79033	ERI3
55	GLYGRTIEL	55908	C19orf80
56	GVLPGLVGV	162515	SLC16A11
57	HLTEAIQYV	6097	RORC
58	ILADLNLSV	55705	IPO9
59	ILADTFIGV	222223	KIAA1324L
60	ILSPLSVAL	5345	SERPINF2
61	KIADFELPTI	338	APOB
62	KIAGTNAEV	2752	GLUL
63	KIDEKNFVW	5887	RAD23B
64	KILEETLYV	8443	GNPAT
65	KLFSGDELLEV	8777	MPDZ
66	KLHEEIDRV	1571	CYP2E1
67	KLKETIQKL	338	APOB
68	KLLAATVLLL	336	APOA2
69	KLLDEVTYLEA	1573	CYP2J2
70	KLLDLETERILL	2803	GOLGA4
71	KLLDNWDSV	335	APOA1
72	KLSEAVTSV	55258	THNSL2
73	KLTLVIISV	8647	ABCB11
74	KLYDLELIV	570	BAAT
75	KQMEPLHAV	284111	SLC13A5
76	LLADIGGDPFAA	3268	AGFG2
77	LLHEENFSV	6942	TCF20
78	LLIDDEYKV	23065	EMC1
79	LLLSTGYEA	23556	PIGN
80	LLYEGKLTLL	440107	PLEKHG7
81	NLASFIEQVAV	5092	PCBD1
82	NVFDGLVRV	338	APOB
83	QLHDFVMSL	8647	ABCB11
84	QLTPVLVSV	1244	ABCC2
85	RILPKVLEV	10840	ALDH1L1
86	RLAAFYSQV	91289	LMF2
87	RLFEEENDVNL	5053	PAH

SEQ ID No.	Последовательность	Идент. номер(а) гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
88	RLIDRIKTV	60560	NAA35
89	RLIEEIKNV	347051	SLC10A5
90	RLLDVLAPLV	80781	COL18A1
91	RLPDIPLRQV	55656	INTS8
92	RLPPDTLLQQV	5986	RFNG
93	RLYTMDGITV	1571	CYP2E1
94	RMSDVVKGV	113251	LARP4
95	SICNGVPMV	54575, 54576, 54577, 54578, 54579, 54600, 54657, 54658, 54659	UGT1A10,UGT1A8,UGT1A7, UGT1A6,UGT1A5,UGT1A9,U GT1A4,UGT1A1,UGT1A3
96	SLLEPNVIRV	4703	NEB
97	SLLPQLIEV	338	APOB
98	SLLSPEHLQYL	7512	XPNPEP2
99	SLSAFLPSL	54757	FAM20A
100	SLVGDIGNVNM	1401	CRP
101	SLWEGGVRGV	411	ARSB
102	SLWSVARGV	57678	GPAM
103	SMGDHLWVA	2752	GLUL
104	SVWFGPKEV	28982	FLVCR1
105	SVYDGKLLI	5445	PON2
106	TLAAIIHGA	5243	ABCB1
107	TLGQFYQEV	3700, 375346	ITIH4,TMEM110
108	TLLKKISEA	84675	TRIM55
109	TLYALSHAV	338	APOB
110	TVGGSEILFEV	1401	CRP
111	TVMDIDTSGTFNV	26063, 4833	DECR2,NME4
112	VLGEVKVGV	122622	ADSSL1
113	VLMDKLVLEL	338	APOB
114	VLSQVYSKV	338	APOB
115	VVLDDKDYFL	100292290, 3336	HSPE1
116	WVIPAISAV	1528	CYB5A
117	YAFPKSITV	6566	SLC16A1
118	YLDDEKNWGL	5005	ORM2
119	YLDKNLTVSV	100293534, 720, 721	C4A,C4B
120	YLGEEYVKA	7018	TF
121	YLITGNLEKL	1314	COPA
122	YLSQAADGAKVL	2584	GALK1

SEQ ID No.	Последовательность	Идент. номер(а) гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
123	YLWDLDHGFAGV	832	CAPZB
124	LLIDVVTYL	338	APOB
125	ALYGRLEVV	23294	ANKS1A
126	TLLDSPIKV	338	APOB
127	VLIGSNHSL	9919	SEC16A
128	GLAFSLNGV	81502	HM13
129	SQADVIPAV	55034	MOCOS
130	ALDAGAVYTL	10840	ALDH1L1
131	ALDSGAFQSV	55907	CMAS
132	ALHEEVGV	1593	CYP27A1
133	ALLEMDARL	54512	EXOSC4
134	ALLETNPYLL	1209	CLPTM1
135	ALLGKIEKV	2590	GALNT2
136	ALLNQHYQV	2058	EPRS
137	ALPTVLVGV	5351	PLOD1
138	ALSQVTL	392636	AGMO
139	ALSSKPAEV	256987	SERINC5
140	ALTSISAGV	392636	AGMO
141	AMGEKSFSV	57720	GPR107
142	AVIGGLIYV	366	AQP9
143	FILPDSLPLDTL	6632	SNRPD1
144	FIQLITGV	477, 478	ATP1A2,ATP1A3
145	FLIAEYFEHV	23743, 635	BHMT2,BHMT
146	FLWTEQAHTV	3953	LEPR
147	GLAPGGLAVV	58525	WIZ
148	GLFAPLVFL	6566	SLC16A1
149	GLLSGLDIMEV	383	ARG1
150	GLSNLGIKSI	122553	TRAPPC6B
151	HLAKVTAEV	6184	RPN1
152	KLDNNLDSV	80232	WDR26
153	KLIEVNEEL	100507203	SMLR1
154	KLTDHLKYV	3250	HPR
155	LLEPYKPPSAQ	439	ASNA1
156	LLFPHPVNQV	8518	IKBKAP
157	QLLPNLRAV	5092	PCBD1
158	RIISGLVKV	101060372, 2330	FMO5
159	RLFPDGIVTV	152831	KLB
160	RLLAKIICL	3075	CFH
161	RLLDEQFAV	9026	HIP1R

SEQ ID No.	Последовательность	Идент. номер(а) гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
162	RLMSALTQV	9462	RASAL2
163	RLTESVLYL	368	ABCC6
164	RMLIKLLEV	6710, 6711	SPTB,SPTBN1
165	RVIEHVEQV	3034	HAL
166	SILDIVTKV	130132	RFTN2
167	SLAESSFDV	54658	UGT1A1
168	SLAVLVPIV	1361	CPB2
169	SLFEWFHPL	2519	FUCA2
170	SLHNGVIQL	1314	COPA
171	SLIPAVLTV	57462	KIAA1161
172	SLLNFLQHL	2968	GTF2H4
173	SLTSEIHFL	55755	CDK5RAP2
174	TLAELGAVQV	2875	GPT
175	TLFEHLPHI	2888	GRB14
176	TLGQIWDV	1778	DYNC1H1
177	VLDEPYEKV	100034743, 5174, 728939	PDZK1P2,PDZK1,PDZK1P1
178	YIFTPKSV	22862	FNDC3A
179	YIHNILYEV	160518	DENND5B
180	YLGPHIASVTL	81671	VMP1
181	YLLEKFVAV	1663, 440081, 642846	DDX11,DDX12P
182	YLLHFPMAL	1109	AKR1C4
183	YLYNNEEQVGL	1109	AKR1C4
184	VVLDGGQIVTV	6506	SLC1A2
185	ALFPALRPGGFQA	8878	SQSTM1
186	VLLAQIIQV	89797	NAV2

Таблица 2: Пептиды HLA-A*24 в соответствии с настоящим изобретением с номерами SEQ ID - S* = фосфосерин

SEQ ID No.	Последовательность	Идент. номер(а) гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
187	SYPTFFPRF	6596	HLTF
188	RYSAGWDAKF	8630	HSD17B6
189	AFSPDSHYLLF	3679	ITGA7
190	RYNEKCFKL	54800	KLHL24
191	KYPDIIISRI	3978	LIG1
192	SYITKPEKW	79694	MANEA
193	IYPGAFVDL	51360	MBTPS2
194	QYASRFVQL	10733	PLK4

SEQ ID No.	Последовательность	Идент. номер(а) гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
195	RYAPPPSFSEF	29066	ZC3H7A
196	AYLKWISQI	60561	RINT1
197	RWPKKSAEF	100132742, 100526842, 6139, 645296, 645441	RPL17P7, RPL17-C18orf32, RPL17, RPL17P39, RPL17P6
198	LYWSHPRKF	6235, 648343	RPS29, RPS29P9
199	KFVTVQATF	718	C3
200	AYLLQPSQF	732	C8B
201	AYVNTFHNI	1201	CLN3
202	AYGTYRSNF	9919	SEC16A
203	YYGILQEKI	10237	SLC35B1
204	KYRLTYAYF	2266	FGG
205	VYGLQRNLL	57159, 84675, 84676	TRIM54, TRIM55, TRIM63
206	KWPETPLLL	55757	UGGT2
207	IYLERFPIF	51096	UTP18
208	SYNPAENAVLL	1314	COPA
209	VFHPRQELI	1314	COPA
210	AYPAIRYLL	7818	DAP3
211	IYIPSYFDF	27042	DIEXF
212	VYGDVISNI	8893	EIF2B5
213	YYNKVSTVF	8661	EIF3A
214	IYVTSIEQI	55879	GABRQ
215	IYTGNISF	8836	GGH
216	IYADVGEEF	100302182, 11052	MIR1279, CPSF6
217	DYIPYVFKL	338	APOB
218	VYQGAIRQI	338	APOB

Таблица 3: Дополнительные пептиды в соответствии с настоящим изобретением, ассоциация которых с раком не была известна ранее - S* = фосфосерин

SEQ ID No.	Последовательность	Идент. номер(а) гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
219	GVMAGDIYSV	123	PLIN2
220	SLLEKELESV	1819	DRG2
221	ALCEENMRGV	1938	EEF2
222	LTDITKGV	1938	EEF2
223	FLFNTENKLLL	3422	IDI1
224	ALASVIKEL	28981	IFT81

225	KMDPVAYRV	5859	QARS
226	AVLGPLGLQEV	79178	THTPA
227	ALLKVNQEL	25813	SAMM50
228	YLITSVELL	2182	ACSL4
229	KMFESFIESV	5576	PRKAR2A
230	VLTEFTREV	55705	IPO9
231	RLFNDPVAMV	10195	ALG3
232	KLAEIVKQV	8550	MAPKAPK5
233	ALLGKLDAI	5876	RABGGTB
234	YLEPYLKEV	727947,7381	UQCRB
235	KLFEEIREI	255394	TCP11L2
236	ALADKELLPSV	84883	AIFM2
237	ALRGEIETV	10128	LRPPRC
238	AMPPPPQGV	5885	RAD21
239	FLLGFIPAKA	5976	UPF1
240	FLWERPTLLV	79922	MRM1
241	FVLPLLGLHEA	55161	TMEM33
242	GLFAPVHKV	6249	CLIP1
243	GLLDNPELRV	26263	FBXO22
244	KIAELLENV	9100	USP10
245	KLGAVFNQV	23450	SF3B3
246	KLISSYYNV	84928	TMEM209
247	KLLDTMVDTFL	100527963,11243	PMF1-BGLAP,PMF1
248	KLNDLIQRL	1314	COPA
249	LLLGERVAL	23475	QPRT
250	NLAEVVERV	26263	FBXO22
251	RLFADILNDV	64755	C16orf58
252	RTIEYLEEV	3030	HADHA
253	RVPPPPQSV	6464	SHC1
254	RVQEIAIEV	57678	GPAM
255	SLFGQDVKAV	26036	ZNF451
256	SLFQGVEFHVY	3930	LBR
257	SLLEKAGPEL	54625	PARP14
258	SLMGPVVHEV	5116	PCNT
259	TLITDGMRSV	29894	CPSF1
260	TLMDMRLSQV	24148	PRPF6
261	VLFQEALWHV	2194	FASN
262	VLPNFLPYNV	10299	MARCH6
263	VLYPSLKEI	50717,5824	DCAF8,PEX19
264	VMQDPEFLQSV	266971,5710	PIPSL,PSMD4
265	WLIEDGKVVTV	10726	NUDC

266	SLLESNKDLLL	6520	SLC3A2
267	ALNENINQV	80025	PANK2
268	KLYQEVEIASV	5976	UPF1
269	YLMEGSYNKV	5714	PSMD8
270	SVLDQKILL	9875	URB1
271	LLLDKLILL	85440	DOCK7
272	QLDSKFLEQV	6772	STAT1
273	AILETAPKEV	6238	RRBP1
274	ALAEALKEV	55164	SHQ1
275	ALIEGAGILL	10440	TIMM17A
276	ALLEADVNIKL	6729	SRP54
277	ALLEENSTPQL	83933	HDAC10
278	ALTSVVVTL	1021	CDK6
279	ALWTGMHTI	51479	ANKFY1
280	ATLNIIHSV	51542	VPS54
281	GLLAGDRLVEV	9368	SLC9A3R1
282	GQFPSYLETV	54919	HEATR2
283	ILSGIGVSQV	3703	STT3A
284	KLDAFVEGV	528	ATP6V1C1
285	KLLDLSDESTSV	6093	ROCK1
286	KVLDKVFRA	375056	MIA3
287	LIGEFLEKV	8731	RNMT
288	LLDDSLVSI	25824	PRDX5
289	LLLEEGGLVQV	7353	UFD1L
290	NLIDLDDLYV	57187	THOC2
291	QLIDYERQL	11072	DUSP14
292	RIPAYFVTV	7407	VAR5
293	FLASESLIKQI	4736	RPL10A
294	RLIDLHTNV	23256	SCFD1
295	SLFSSPPEI	252983	STXBP4
296	SLLSGRISTL	51133,92799	KCTD3,SHKBP1
297	TLFYSLREV	80233	C17orf70
298	TMAKESSIIGV	1429	CRYZ
299	ALLRVTPFI	401505	TOMM5
300	TLAQQPTAV	4802	NFYC

Таблица 4: Пептиды, полезные, например, для персонализированной противораковой терапии - S* = фосфосерин

SEQ ID No.	Последовательность	Идент. номер(а) гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
301	VLADFGARV	114899,23600	C1QTNF3,AMACR

SEQ ID No.	Последовательность	Идент. номер(а) гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
302	KIQEILTQV	10643	IGF2BP3
303	GVYDGEHHSV	4113	MAGEB2
304	SLIDQFFGV	9097	USP14
305	GVLENIFGV	399909	PCNXL3
306	KLVEFDLGA	10460	TACC3
307	AVVEFLTSV	29102	DROSHA
308	ALLRTVVSV	2590	GALNT2
309	GLIEIISNA	23020	SNRNP200
310	SLWGGDVVL	157680	VPS13B
311	FLIPIYHQV	31	ACACA
312	RLGIKPESV	1466	CSRP2
313	LTAPPEALLMV	79050	NOC4L
314	YLAPFLRNV	23019	CNOT1
315	KVLDGSPIEV	29974	A1CF
316	LLREKVEFL	4779	NFE2L1
317	KLPEKWESV	26156	RSL1D1
318	KLNEINEKI	1373	CPS1
319	KLFNEFIQL	10885	WDR3
320	GLADNTVIAKV	6897	TARS
321	GVIAEILRGV	10528	NOP56
322	ILYDIPDIRL	10667	FARS2
323	KIIDEDGLLNL	5981	RFC1
324	RLFETKITQV	100293534,720,721	C4A,C4B
325	RLSEAIVTV	51249	TMEM69
326	ALSDGVHKI	55179	FAIM
327	GLNEEIARV	10403	NDC80
328	RLEEDDGDVAM	10482	NXF1
329	SLIEDLILL	64754	SMYD3
330	SMSADVPLV	5111	PCNA
331	SLLAQNTSWLL	7070	THY1
332	AMLAVLHTV	60673	C12orf44
333	GLAEDIDKGEV	1938	EEF2
334	SILTIEDGIFEV	100287551,3306,3312	HSPA8P8,HSPA2,HSPA8
335	SLLPVDIRQYL	6773	STAT2
336	YLPTFFLTV	54898	ELOVL2
337	TLLAAEFLLKQV	100288772,10574	CCT7P2,CCT7
338	KLFDSDPITVTV	1191	CLU
339	RLISKFDTV	1977	EIF4E
340	KVFDEVIEV	8908	GYG2
341	YLAIGIHEL	3034	HAL

SEQ ID No.	Последовательность	Идент. номер(а) гена	Официальный(ые) символ(ы) гена
342	AMSSKFFLV	7474	WNT5A
343	LLLPDYLV	27044	SND1
344	VYISSLALL (A*24)	10213	PSMD14
345	SYNPLWLRI (A*24)	259266	ASPM
346	LYQILQGIVF (A*24)	983	CDK1
347	ALNPADITV	51497	TH1L
348	AYKPGALTF	84883	AIFM2

Настоящее изобретение далее, в основном, относится к пептидам в соответствии с настоящим изобретением для применения в лечении пролиферативных заболеваний, таких как, например, рака поджелудочной железы, рака толстой кишки или прямой кишки, рака почек, рака головного мозга и(или) лейкозов.

В частности, 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: 300. Более предпочтительными являются пептиды – в отдельности или в комбинации – выбранные из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 124 (см. Таблицу 1), предпочтительно для связывания с A*02, и из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 187 по SEQ ID NO: 218 (см. Таблицу 2), предпочтительно для связывания с A*24, и их применение в иммунотерапии ГКК, рака головного мозга, рака почек, рака поджелудочной железы, рака толстой или прямой кишки или лейкоза и, предпочтительно, ГКК.

Как показано в последующих Таблицах 5А и Б, многие из пептидов в соответствии с настоящим изобретением могут также применяться в иммунотерапии при других показаниях. Для выбранных пептидов таблицы демонстрируют, на каких дополнительных видах опухолей они были обнаружены с избыточной презентацией (включая специфическую презентацию) на более чем 5% оцененных опухолевых образцов, или презентацией на более чем 5% оцененных опухолевых образцов с соотношением среднего геометрического для опухоли для нормальных тканей, составляющим более 3. Избыточная презентация определяется как более высокая

представленность на опухолевом образце по сравнению с образцом нормальной ткани с наивысшей презентацией. Нормальными тканями, на основе которых проводили испытание на избыточную презентацию, были: жировая ткань, ткань надпочечной железы, клетки крови, кровеносные сосуды, ткань костного мозга, головного мозга, хрящевая ткань, ткань пищевода, глаз, желчного пузыря, сердца, почек, толстой кишки, печени, легких, лимфатических узлов, нервная ткань, ткань поджелудочной железы, паращитовидной железы, брюшной полости, гипофиза, плевры, слюнной железы, скелетных мышц, кожа, ткань тонкого кишечника, селезенки, желудка, щитовидной железы, трахеи, мочеточника, мочевого пузыря.

Таблица 5А. Пептиды в соответствии с настоящим изобретением и их конкретное применение при других пролиферативных заболеваниях, в особенности при других раковых заболеваниях - S* = фосфосерин

SEQ ID No.	Последовательность	Другие релевантные органы / заболевания
1	VMAPFTMTI	Поджелудочная железа
6	KLSPTVVGL	Толстая кишка, прямая кишка
10	SLLEEFDFHV	Почки
14	ALADLTGTVV	Почки, головной мозг, поджелудочная железа
15	LLYGHTVTV	Почки, головной мозг, толстая кишка, прямая кишка, поджелудочная железа
16	SLLGGNIRL	Головной мозг, толстая кишка, прямая кишка
17	RVAS*PTSGV	Головной мозг
22	RIAGIRGIQGV	Почки, толстая кишка, прямая кишка
26	SLLHTIYEV	Толстая кишка, прямая кишка
30	YLGEGPRMV	Толстая кишка, прямая кишка, ХЛЛ
34	SLAEGTATV	Толстая кишка, прямая кишка
36	ILNVDGLIGV	Почки, головной мозг, толстая кишка, прямая кишка
39	ALDPKANFST	Почки, головной мозг
41	ALLELDEPLVL	Поджелудочная железа
43	ALLGVWTSV	Поджелудочная железа
47	FLDTPIAKV	Головной мозг, толстая кишка, прямая кишка
51	GLAEELVRA	Головной мозг
54	GLLDPNVKSIFV	Почки, головной мозг

SEQ ID No.	Последовательность	Другие релевантные органы / заболевания
55	GLYGRTIEL	Почки
58	ILADLNLSV	Поджелудочная железа
59	ILADTFIGV	Толстая кишка, прямая кишка, поджелудочная железа
60	ILSPLSVAL	Почки, поджелудочная железа
65	KLFSGDELLEV	Головной мозг, толстая кишка, прямая кишка
69	KLLDEVTYLEA	Толстая кишка, прямая кишка
70	KLLDLETERILL	Толстая кишка, прямая кишка
72	KLSEAVTSV	Почки
77	LLHEENFSV	Почки, толстая кишка, прямая кишка
80	LLYEGKLT	Толстая кишка, прямая кишка
81	NLASFIEQVAV	Почки, толстая кишка, прямая кишка, поджелудочная железа
88	RLIDRIKTV	Головной мозг, толстая кишка, прямая кишка
90	RLLDVLAPLV	Почки
96	SLLEEPNVIRV	Почки
101	SLWEGGVRGV	Головной мозг
112	VLGEVKVGV	Почки
116	WVIPAISAV	Почки
119	YLDKNLTVSV	Почки
121	YLITGNLEKL	Почки, толстая кишка, прямая кишка, поджелудочная железа
123	YLWDLDHGFAGV	Головной мозг, толстая кишка, прямая кишка
125	ALYGRLEVV	Головной мозг, толстая кишка, прямая кишка
127	VLIGSNHSL	Толстая кишка, прямая кишка
133	ALLEMDARL	Почки, головной мозг, толстая кишка, прямая кишка
134	ALLETNPYLL	Головной мозг
135	ALLGKIEKV	Головной мозг, поджелудочная железа
137	ALPTVLVGV	Почки, головной мозг, толстая кишка, прямая кишка
138	ALSQVTLLL	Почки
139	ALSSKPAEV	Толстая кишка, прямая кишка, поджелудочная железа
141	AMGEKSFSV	Головной мозг
144	FIQLITGV	Поджелудочная железа
147	GLAPGGLAVV	Головной мозг

SEQ ID No.	Последовательность	Другие релевантные органы / заболевания
148	GLFAPLVFL	Почки
161	RLLDEQFAV	Головной мозг
166	SILDIVTKV	Головной мозг
169	SLFEWFHPL	Почки, головной мозг, толстая кишка, прямая кишка
170	SLHNGVIQL	Почки
172	SLLNFLQHL	Почки, толстая кишка, прямая кишка, ХЛЛ
173	SLTSEIHFL	ХЛЛ
176	TLGQIWDV	Головной мозг, толстая кишка, прямая кишка, поджелудочная железа
177	VLDEPYEKV	Почки
179	YIHNILYEV	Головной мозг
181	YLLEKFVAV	Толстая кишка, прямая кишка
184	VVLDGGQIVTV	Головной мозг
186	VLLAQIIQV	Почки, головной мозг, толстая кишка, прямая кишка
187	SYPTFFPRF	Почки, головной мозг
189	AFSPDSHYLLF	Почки, головной мозг
191	KYPDIIISRI	Головной мозг
192	SYITKPEKW	Почки, головной мозг
193	IYPGAFVDL	Головной мозг
194	QYASRFVQL	Головной мозг
195	RYAPPPSFSEF	Головной мозг
196	AYLKWISQI	Головной мозг
197	RWPKKSAEF	Почки, головной мозг
198	LYWSHPRKF	Почки
199	KFVTVQATF	Головной мозг
203	YYGILQEKI	Почки, головной мозг
206	KWPETPLLL	Почки, головной мозг
208	SYNPAENAVLL	Головной мозг
214	IYVTSIEQI	Головной мозг
219	GVMAGDIYSV	Почки
220	SLLEKELESV	Головной мозг
221	ALCEENMRGV	Почки, головной мозг, толстая кишка, прямая кишка
223	FLFNTENKLLL	Толстая кишка, прямая кишка
224	ALASVIKEL	Головной мозг
229	KMFESFIESV	Почки, головной мозг, толстая кишка, прямая кишка

SEQ ID No.	Последовательность	Другие релевантные органы / заболевания
230	VLTEFTREV	Почки, головной мозг, толстая кишка, прямая кишка
231	RLFNDPVAMV	Головной мозг, толстая кишка, прямая кишка
232	KLAEIVKQV	Толстая кишка, прямая кишка
233	ALLGKLDAI	Почки, толстая кишка, прямая кишка
234	YLEPYLKEV	Почки, головной мозг, толстая кишка, прямая кишка
236	ALADKELLPSV	Почки, толстая кишка, прямая кишка, поджелудочная железа
237	ALRGEIETV	Толстая кишка, прямая кишка
238	AMPPPPPQGV	Головной мозг, толстая кишка, прямая кишка
239	FLLGFIPAKA	Головной мозг
240	FLWERPTLLV	ХЛЛ
244	KIAELLENV	Головной мозг, толстая кишка, прямая кишка
245	KLGAVERNQV	Головной мозг
247	KLLDTMVDFTL	Толстая кишка, прямая кишка
248	KLNDLIQRL	Поджелудочная железа
249	LLLGERVAL	Толстая кишка, прямая кишка
250	NLAEVVERV	Головной мозг, толстая кишка, прямая кишка, ХЛЛ
251	RLFADILNDV	Головной мозг, толстая кишка, прямая кишка
255	SLFGQDVKAV	Почки, головной мозг, толстая кишка, прямая кишка
258	SLMGPVVHEV	Головной мозг
259	TLITDGMRSV	Головной мозг
260	TLMDMRLSQV	Почки, головной мозг, толстая кишка, прямая кишка
261	VLFQEALWHV	Толстая кишка, прямая кишка
266	SLLESNKDLLL	Толстая кишка, прямая кишка
268	KLYQEVEIASV	Головной мозг
269	YLMEGSYNKV	Головной мозг, толстая кишка, прямая кишка
270	SVLDQKILL	Почки, головной мозг
271	LLLDKLILL	Головной мозг, толстая кишка, прямая кишка
272	QQLDSKFLEQV	Почки, головной мозг
274	ALAEALKEV	Толстая кишка, прямая кишка

SEQ ID No.	Последовательность	Другие релевантные органы / заболевания
275	ALIEGAGILL	Почки, толстая кишка, прямая кишка, поджелудочная железа
276	ALLEADVNIKL	Поджелудочная железа
277	ALLEENSTPQL	Почки
278	ALTSVVVTL	Почки, головной мозг
279	ALWTGMHTI	Почки, головной мозг
281	GLLAGDRLVEV	Почки
282	GQFPSYLETV	Почки, головной мозг, толстая кишка, прямая кишка
283	ILSGIGVSQV	Поджелудочная железа
285	KLLDLSDESTSV	Почки, толстая кишка, прямая кишка
286	KVLDKVFRA	Поджелудочная железа
287	LIGEFLEKV	ХЛЛ
288	LLDDSLVSI	Поджелудочная железа
289	LLLEEGGLVQV	Почки, толстая кишка, прямая кишка, поджелудочная железа
290	NLIDLDDLYV	Головной мозг, толстая кишка, прямая кишка, поджелудочная железа
291	QLIDYERQL	Почки, толстая кишка, прямая кишка, поджелудочная железа
292	RIPAYFVTV	Почки
293	FLASESLIKQI	Головной мозг, толстая кишка, прямая кишка
295	SLFSSPPEI	Почки, головной мозг
296	SLLSGRISTL	Почки
297	TLFYSLREV	Почки, головной мозг, толстая кишка, прямая кишка
299	ALLRVTPFI	ХЛЛ
300	TLAQQPTAV	Поджелудочная железа
301	VLADFGARV	Почки, толстая кишка, прямая кишка
302	KIQEILTQV	Почки, головной мозг, толстая кишка, прямая кишка, поджелудочная железа, ХЛЛ
304	SLIDQFFGV	Головной мозг, толстая кишка, прямая кишка, поджелудочная железа
305	GVLENIFGV	Почки, головной мозг
306	KLVEFDLGA	Головной мозг, толстая кишка, прямая кишка
308	ALLRTVVSV	Почки, поджелудочная железа
309	GLIEIISNA	Головной мозг
310	SLWGGDVVL	Головной мозг, толстая кишка, прямая кишка

SEQ ID No.	Последовательность	Другие релевантные органы / заболевания
311	FLIPIYHQV	Почки, головной мозг
312	RLGIKPESV	Головной мозг
313	LTAPPEALLMV	Почки, головной мозг, толстая кишка, прямая кишка, поджелудочная железа
315	KVLDGSPIEV	Почки
316	LLREKVEFL	Почки, головной мозг, толстая кишка, прямая кишка, поджелудочная железа
317	KLPEKWESV	Головной мозг, толстая кишка, прямая кишка, поджелудочная железа
319	KLFNEFIQL	Почки, головной мозг, толстая кишка, прямая кишка
321	GVIAEILRGV	Почки, головной мозг
324	RLFETKITQV	Почки
325	RLSEAIIVTV	Головной мозг, поджелудочная железа
326	ALSDGVHKKI	Поджелудочная железа
327	GLNEEIARV	Головной мозг, толстая кишка, прямая кишка
328	RLEEDDGDVAM	Почки, головной мозг, толстая кишка, прямая кишка
329	SLIEDLILL	Почки, головной мозг, толстая кишка, прямая кишка, поджелудочная железа
330	SMSADVPLV	Головной мозг, толстая кишка, прямая кишка
331	SLLAQNTSWLL	Головной мозг, толстая кишка, прямая кишка, поджелудочная железа
332	AMLAVLHTV	Головной мозг, толстая кишка, прямая кишка
333	GLAEDIDKGEV	Почки, головной мозг
334	SILTIEDGIFEV	Почки, головной мозг, толстая кишка, прямая кишка, поджелудочная железа, ХЛЛ
335	SLLPVDIRQYL	Почки, ХЛЛ
336	YLPTFFLTV	Почки, головной мозг
337	TLLAAEFLKQV	Головной мозг
338	KLFDSDPITVTV	Головной мозг
339	RLISKFDTV	Головной мозг
340	KVFDEVIEV	Головной мозг
342	AMSSKFFLV	Головной мозг, толстая кишка, прямая кишка, поджелудочная железа
343	LLLPDYLLV	Головной мозг, поджелудочная железа
344	VYISSLALL (A*24)	Головной мозг
345	SYNPLWLRI (A*24)	Головной мозг

SEQ ID No.	Последовательность	Другие релевантные органы / заболевания
346	LYQILQGIVF (A*24)	Почки
347	ALNPADITV	Головной мозг

Таблица 5Б: Пептиды в соответствии с настоящим изобретением и их конкретное применение при других пролиферативных заболеваниях, в особенности при других раковых заболеваниях- S* = фосфосерин

SEQ ID NO.	Последовательность	Дополнительные виды заболеваний
189	AFSPDSHYLLF	НМРЛ, РПрЖ
273	AILETAPKEV	Рак пищевода
236	ALADKELLPSV	НМРЛ, МРЛ, РЖ, меланома, РЯ, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, НХЛ
14	ALADLTGTVV	НМРЛ, МРЛ, РМЖ, РЯ, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак матки, РПЖ
38	ALADVVEHA	РМЖ, РЯ
274	ALAEALKEV	РМЖ, ККМ, меланома, РЯ, рак матки, ОМЛ
9	ALANQKLYSV	НМРЛ, КРК, ККМ, РЯ, рак мочевого пузыря, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, РПЖ
224	ALASVIKEL	МРЛ, РПЖ, меланома
221	ALCEENMRGV	НМРЛ, МРЛ, ККМ, меланома
131	ALDSGAFQSV	КРК, меланома, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
185	ALFPALRPGGFQA	Рак желчного пузыря, рак желчных протоков
275	ALIEGAGILL	МРЛ, ККМ, меланома, РЯ, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак матки, НХЛ
276	ALLEADVNIKL	Рак желчного пузыря, рак желчных протоков, РЯ
277	ALLEENSTPQL	МРЛ, ХЛЛ, меланома, РЯ, рак пищевода, рак мочевого пузыря, НХЛ
133	ALLEMDARL	НМРЛ, МРЛ, РМЖ, ККМ, меланома, РЯ, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, ОМЛ, НХЛ
134	ALLETNPYLL	Рак мочевого пузыря, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
135	ALLGKIEKV	НМРЛ, МРЛ, РМЖ, РЯ, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
233	ALLGKLDAI	ХЛЛ, РЯ, рак мочевого пузыря, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, ОМЛ, НХЛ

43	ALLGVWTSV	МРЛ, рак головного мозга, ХЛЛ, РМЖ, РПЖ
227	ALLKVNQEL	Меланома, рак матки
136	ALLNQHYQV	РМЖ, РЯ
299	ALLRVTPFI	НХЛ, РЯ
32	ALNAVRLLV	МРЛ
267	ALNENINQV	МРЛ, рак головного мозга, ККМ, меланома, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
137	ALPTVLVGV	НМРЛ, РЖ, РМЖ, меланома, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, РПЖ
45	ALQDQLVLV	МРЛ, рак головного мозга
237	ALRGEIETV	МРЛ, РМЖ, РЯ, рак пищевода, рак мочевого пузыря, НХЛ
139	ALSSKPAEV	РПрЖ, РЯ, рак матки
278	ALTSVVVTL	НМРЛ, МРЛ, РЖ, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, ОМЛ, НХЛ
279	ALWTGMHTI	Рак пищевода, рак мочевого пузыря, РПЖ
125	ALYGRLEVV	РМЖ, ККМ, меланома, РЯ, рак мочевого пузыря, рак матки
141	AMGEKSFSV	Меланома
238	AMPPPPPQGV	НМРЛ, МРЛ, РМЖ, ККМ, меланома, РЯ, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, НХЛ
342	AMSSKFFLV	НМРЛ, РЖ, РПрЖ, РМЖ, меланома, РЯ, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, РПЖ
280	ATLNIIHSV	Рак мочевого пузыря
226	AVLGPLGLQEV	РПрЖ, меланома, РЯ
202	AYGTYRSNF	НМРЛ
196	AYLKWISQI	НМРЛ
210	AYPAIRYLL	НМРЛ, РЖ
144	FIQLITGV	НМРЛ, рак головного мозга, рак мочевого пузыря
293	FLASESLIKQI	НМРЛ, РПрЖ, ККМ, меланома, РЯ, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, НХЛ, РПЖ
47	FLDTPIAKV	НМРЛ, РЖ, рак пищевода
223	FLFNTENKLLL	Меланома, рак мочевого пузыря, НХЛ
145	FLIAEYFEHV	МРЛ
239	FLLGFIPAKA	Рак мочевого пузыря, ОМЛ, НХЛ
128	GLAFSLNGV	Меланома, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков

147	GLAPGGLAVV	НМРЛ, МРЛ, РПрЖ, РМЖ, меланома, РЯ, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак матки
148	GLFAPLVFL	Рак пищевода, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, НХЛ
242	GLFAPVHKV	Рак мочевого пузыря
52	GLFNAELLEA	МРЛ
281	GLLAGDRLVEV	НМРЛ, МРЛ, РЯ, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, НХЛ
243	GLLDNPELRV	Рак мочевого пузыря
54	GLLDPNVKSIFV	НМРЛ, МРЛ, РЯ, рак мочевого пузыря
149	GLLSGLDIMEV	МРЛ
150	GLSNLGIKSI	Рак мочевого пузыря, НХЛ
55	GLYGRTIEL	МРЛ
282	GQFPSYLETV	НМРЛ, ХЛЛ, меланома, РЯ, рак пищевода, рак мочевого пузыря, НХЛ
219	GVMAGDIYSV	МРЛ, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, РПЖ
151	HLAKVTAEV	МРЛ, РЯ, рак мочевого пузыря
57	HLTEAIQYV	НХЛ
58	ILADLNLSV	РМЖ
59	ILADTFIGV	НМРЛ, МРЛ, РЖ, РЯ, рак мочевого пузыря, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, НХЛ
36	ILNVDGLIGV	НМРЛ, МРЛ, РПрЖ, меланома, РЯ, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, НХЛ, РПЖ
283	ILSGIGVSQV	НМРЛ, РПрЖ, РМЖ, меланома, РЯ, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, НХЛ, РПЖ
216	IYADVGEEF	НМРЛ, РЖ, РПрЖ
211	IYIPSYFDF	НМРЛ, рак головного мозга, РЖ
207	IYLERFPIF	НМРЛ, РЖ
193	IYPGAFVDL	НМРЛ
214	IYVTSIEQI	НМРЛ, ПКК
244	KIAELLENV	НМРЛ, МРЛ, РПрЖ, ХЛЛ, РМЖ, меланома, РЯ, рак матки, ОМЛ, НХЛ
62	KIAGTNAEV	РМЖ
63	KIDEKNFVV	МРЛ, рак головного мозга, рак мочевого пузыря, рак матки
64	KILEETLYV	Рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак матки
302	KIQEILTQV	НМРЛ, МРЛ, РЖ, меланома, РЯ, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, ОМЛ, НХЛ, РПЖ

232	KLAEIVKQV	НМРЛ, МРЛ, РМЖ, меланома, РЯ, рак мочевого пузыря
284	KLDAFVEGV	РМЖ, РЯ
152	KLDNNLDSV	РМЖ, меланома
235	KLFEIIEI	НМРЛ, КРК, меланома, рак мочевого пузыря
245	KLGAVERNQV	НМРЛ, МРЛ, ПКК, РПрЖ, РМЖ, меланома, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак матки
246	KLISSYYNV	РЯ
69	KLLDEVTYLEA	Рак мочевого пузыря
70	KLLDLETERILL	РЯ, рак матки
285	KLLDLSDESTSV	МРЛ, рак матки
247	KLLDTMVDFTL	НМРЛ, МРЛ, ПКК, рак головного мозга, ХЛЛ, РМЖ, РЯ, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак матки, ОМЛ, НХЛ
8	KLLEEATISV	МРЛ, ККМ, меланома, рак мочевого пузыря, рак матки
248	KLNDLIQRL	РЖ, рак матки
20	KLSNVLQQV	МРЛ
6	KLSPTVVGL	ХЛЛ, РЯ
154	KLTDHLKYV	МРЛ
268	KLYQEVEIASV	КРК, ККМ, меланома, рак мочевого пузыря
225	KMDPVAYRV	КРК, РПрЖ, РМЖ, рак мочевого пузыря, рак матки
229	KMFESFIESV	НМРЛ, МРЛ, РПрЖ, РЯ, рак мочевого пузыря
286	KVLDKVFRA	КРК, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
206	KWPETPLLL	РЖ
191	KYPDIIISRI	НМРЛ, РЖ
287	LIGEFLEKV	МРЛ, ПКК, меланома, РЯ, рак пищевода, рак мочевого пузыря, НХЛ
288	LLDDSLVSI	Меланома, рак мочевого пузыря, ОМЛ
156	LLFPHPVNQV	НМРЛ, МРЛ, РЯ, рак пищевода, рак мочевого пузыря
77	LLHEENFSV	НМРЛ, МРЛ, РЯ, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, НХЛ
78	LLIDDEYKV	Рак пищевода, рак мочевого пузыря, РПЖ
271	LLLDKLILL	ХЛЛ, меланома, РЯ, рак мочевого пузыря, рак матки
289	LLLEEGGLVQV	НМРЛ, МРЛ, РПрЖ, меланома, РЯ, рак мочевого пузыря, НХЛ
249	LLLGERVAL	РЯ
37	LLLPLLPPLSP	МРЛ, РПЖ, ККМ, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков

80	LLYEGKLTTL	РЯ
15	LLYGHTVTV	НМРЛ, МРЛ, РМЖ, меланома, РЯ, рак пищевода, рак мочевого пузыря, НХЛ, РПЖ
222	LTDITKGV	РМЖ, НХЛ
346	LYQILQGIVF	НМРЛ, рак головного мозга, РЖ
198	LYWSHPRKF	НМРЛ
250	NLAEVVERV	НМРЛ, МРЛ, РПРЖ, РМЖ, ККМ, РЯ, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
81	NLASFIEQVAV	МРЛ, РПРЖ, РЯ, рак матки, НХЛ
290	NLIDLDDLYV	МРЛ, РПРЖ, ККМ, РЯ, рак мочевого пузыря, рак матки
291	QLIDYERQL	НМРЛ, МРЛ, рак головного мозга, РМЖ, меланома, рак пищевода, рак мочевого пузыря, НХЛ, РПЖ
157	QLLPNLRAV	ПКК
272	QQLDSKFLEQV	ККМ, РЯ, НХЛ
194	QYASRFVQL	НМРЛ, РЖ
22	RIAGIRGIQGV	НМРЛ, РПРЖ, РМЖ, РЯ, НХЛ
292	RIPAYFVTV	РЖ, РМЖ, меланома, НХЛ
86	RLAAFYSQV	ОМЛ
251	RLFADILNDV	НМРЛ, МРЛ, РПРЖ, меланома, рак мочевого пузыря, рак матки
231	RLFNDPVAMV	НМРЛ, МРЛ, ККМ, меланома, РЯ, рак мочевого пузыря, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
294	RLIDLHTNV	Рак пищевода
88	RLIDRIKTV	НМРЛ, МРЛ, РЯ, ОМЛ, НХЛ
89	RLIEEIKNV	МРЛ
161	RLLDEQFAV	МРЛ, РМЖ
90	RLLDVLAPLV	РМЖ
91	RLPDIPLRQV	НМРЛ, ХЛЛ, рак мочевого пузыря, НХЛ
92	RLPPDTLLQQV	Рак мочевого пузыря
23	RLYDPASGTISL	ХЛЛ, меланома, НХЛ
164	RMLIKLLEV	МРЛ, КРК
94	RMSDVVKGV	РМЖ, РЯ
252	RTIEYLEEV	Меланома
17	RVAJPTSGV	ОМЛ
197	RWPKKSAEF	НМРЛ
195	RYAPPPSFSEF	НМРЛ
190	RYNEKCFKL	НМРЛ
95	SICNGVPMV	Рак мочевого пузыря

166	SILDIVTKV	МРЛ, ХЛЛ, ККМ, меланома, рак мочевого пузыря, ОМЛ
24	SLAEEKLQASV	РПрЖ, РМЖ, рак мочевого пузыря
169	SLFEWFHPL	НМРЛ, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
255	SLFGQDVKAV	НМРЛ, МРЛ, ХЛЛ, РМЖ, ККМ, меланома, РЯ, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, НХЛ, РПЖ
256	SLFQGVEFHVY	КРК, ХЛЛ, ККМ, НХЛ
295	SLFSSPPEI	НМРЛ, МРЛ, КРК, РПрЖ, РМЖ, меланома, РЯ, рак мочевого пузыря, рак матки
170	SLHNGVIQL	НМРЛ, рак мочевого пузыря, рак матки, НХЛ
331	SLLAQNTSWLL	НМРЛ, ПКК, РЖ, РМЖ, меланома, рак пищевода, рак мочевого пузыря
10	SLLEEFDFHV	НМРЛ, РМЖ, РЯ, рак пищевода, рак матки
96	SLLEEPNVIRV	Меланома, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
257	SLLEKAGPEL	ХЛЛ, меланома, РЯ
220	SLLEKELESV	НМРЛ, МРЛ, РПрЖ, ХЛЛ, РМЖ, РЯ, рак пищевода, рак мочевого пузыря, НХЛ
266	SLLESNKDLLL	МРЛ, ККМ, рак матки
16	SLLGGNIRL	РЖ, РПрЖ, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак матки, РПЖ
26	SLLHTIYEV	РПрЖ, РМЖ, рак пищевода, НХЛ
172	SLLNFLQHL	ОМЛ
97	SLLPQLIEV	МРЛ
296	SLLSGRISTL	РМЖ, рак мочевого пузыря
258	SLMGPVVHEV	МРЛ, ККМ, меланома, РЯ, рак мочевого пузыря, НХЛ
35	SLQESILAQV	НМРЛ, МРЛ, РПрЖ, ККМ, меланома, рак мочевого пузыря, ОМЛ
99	SLSAFLPSL	РЯ, рак пищевода, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, НХЛ
11	SLSQELVGV	Рак головного мозга, меланома, рак матки, НХЛ
173	SLTSEIHFL	Рак матки, НХЛ
101	SLWEGGVRGV	Меланома
103	SMGDHLWVA	РМЖ, рак мочевого пузыря, НХЛ
330	SMSADVPLV	НМРЛ, МРЛ, РМЖ, ККМ, меланома, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, ОМЛ, НХЛ
129	SQADVIPAV	Рак мочевого пузыря

270	SVLDQKILL	Меланома, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, НХЛ
104	SVWFGPKEV	МРЛ, меланома, рак мочевого пузыря, РПЖ
192	SYITKPEKW	НМРЛ
208	SYNPAENAVLL	НМРЛ
345	SYNPLWLRI	НМРЛ, ПКК, РЖ
187	SYPTFFPRF	НМРЛ, РПрЖ
300	TLAQQPTAV	Рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, НХЛ
297	TLFYSLREV	РМЖ, рак матки, ОМЛ
176	TLGQIWDV	НМРЛ, РЖ, меланома, рак мочевого пузыря, РПЖ
259	TLITDGMRSV	ПКК, КРК, РЯ, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, РПЖ
260	TLMDMRLSQV	МРЛ, РПрЖ, ХЛЛ, РЯ, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
298	TMAKESSIIGV	МРЛ, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
110	TVGGSEILFEV	МРЛ, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
111	TVMDIDTSGTF NV	МРЛ, КРК, ХЛЛ, меланома, РЯ, рак мочевого пузыря, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, НХЛ
209	VFHPRQELI	НМРЛ
261	VLFQEALWHV	Рак мочевого пузыря
127	VLIGSNHSL	РПЖ, РМЖ, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак матки, ОМЛ
186	VLLAQIIQV	Меланома, РЯ, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
262	VLPNFLPYNV	НМРЛ, МРЛ, рак головного мозга, РЖ, РМЖ, ККМ, меланома, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, НХЛ, РПЖ
114	VLSQVYSKV	МРЛ
230	VLTEFTREV	НМРЛ, МРЛ, ХЛЛ, РМЖ, меланома, РЯ, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, НХЛ
263	VLYPSLKEI	ПКК, РМЖ, рак матки
1	VMAPFTMTI	МРЛ, меланома, НХЛ
264	VMQDPEFLQSV	МРЛ, КРК, РПЖ, ХЛЛ, меланома, РЯ, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, НХЛ
115	VVLDDKDYFL	ХЛЛ
344	VYISSLALL	НМРЛ, РЖ, КРК
265	WLIEDGKVVTV	Меланома
117	YAFPKSITV	РПЖ

178	YIFTPKSV	ОМЛ
179	YIHNILYEV	ХЛЛ, НХЛ
341	YLAIGIHEL	МРЛ
234	YLEPYLKEV	НМРЛ, МРЛ, РМЖ, меланома, РЯ, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, ОМЛ, НХЛ, РПЖ
30	YLGEGPRMV	НМРЛ, меланома, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
180	YLGPHIASVTL	Меланома
121	YLITGNLEKL	НМРЛ, ХЛЛ, РМЖ, меланома, РЯ, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак матки, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, НХЛ, РПЖ
228	YLITSVELL	РЯ, НХЛ
181	YLLEKFVAV	НМРЛ, МРЛ, ХЛЛ, РЯ, рак мочевого пузыря, ОМЛ, НХЛ
269	YLMEGSYNKV	НМРЛ, МРЛ, РПрЖ, РМЖ, ККМ, меланома, РЯ, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак желчного пузыря, рак желчных протоков
123	YLWDLDHGFA GV	НМРЛ, МРЛ, РПрЖ, РМЖ, меланома, РЯ, рак пищевода, ОМЛ, НХЛ
31	YQMDIQQEL	МРЛ
203	YYGILQEKI	НМРЛ
213	YYNKVSTVF	НМРЛ

НМРЛ= немелкоклеточный рак легких, МРЛ= мелкоклеточный рак легких, ПКК= рак почки, КРК= рак толстого или прямого кишечника, РЖ= рак желудка, ГКК= рак печени, РПЖ= рак поджелудочной железы, РПрЖ= рак предстательной железы, лейкемия, РМЖ= рак молочной железы, ККМ= карцинома клеток Меркеля, РЯ= рак яичника, НХЛ= неходжкинская лимфома, ОМЛ= острый миелоидный лейкоз, ХЛЛ= хронический лимфоцитарный лейкоз.

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, 14, 15, 41, 43, 58, 59, 60, 81, 121, 135, 139, 144, 176, 236, 248, 275, 276, 283, 286, 288, 289, 290, 291, 300, 302, 304, 308, 313, 316, 317, 325, 326, 329, 331, 334, 342 и 343 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения рака поджелудочной железы.

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. 6, 15, 16, 22, 26, 30, 34, 36, 47, 59, 65, 69, 70, 77, 80, 81, 88, 121, 123, 125, 127, 133, 137, 139, 169, 172, 176, 181, 186, 221, 223, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 236, 237, 238, 244, 247, 249, 250, 251, 255, 260, 261, 266, 269, 271, 274, 275, 282, 285, 289, 290, 291, 293, 297, 301, 302, 304, 306, 310, 313, 316, 317, 319, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 334 и 342 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения рака толстой кишки или рака почек.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с последовательностями с SEQ ID NO: 10, 14, 15, 22, 36, 39, 54, 55, 60, 72, 77, 81, 90, 96, 112, 116, 119, 121, 133, 137, 138, 148, 169, 170, 172, 177, 186, 187, 189, 192, 197, 198, 203, 206, 219, 221, 229, 230, 233, 234, 236, 255, 260, 270, 272, 275, 277, 278, 279, 281, 282, 285, 289, 291, 292, 295, 296, 297, 301, 302, 305, 308, 311, 313, 315, 316, 319, 321, 324, 328, 329, 333, 334, 335, 336 и 346 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения рака почки.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного пептида по настоящему изобретению в соответствии с последовательностями с SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 36, 39, 47, 51, 54, 65, 88, 101, 123, 125, 133, 134, 135, 137, 141, 147, 161, 166, 169, 176, 179, 184, 186, 187, 189, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 199, 203, 206, 208, 214, 220, 221, 224, 229, 230, 231, 234, 238, 239, 244, 245, 250, 251, 255, 258, 259, 260, 268, 269, 270, 271, 272, 278, 279, 282, 295, 297, 302, 304, 305, 306, 309, 310, 311, 312, 313, 316, 317, 319, 321, 325, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 336, 337, 338, 339, 340, 342, 343, 344, 345 и 347 – 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

последовательностями с SEQ ID No. 172, 173, 240, 250, 287, 299, 302, 334 и 335 – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – для лечения ХЛЛ.

В равной степени, пептиды, указанные в Таблице 5Б, приведенной выше, могут представлять собой основу для – в одном предпочтительном варианте осуществления в комбинации – лечения заболеваний, как указано.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к применению пептидов в соответствии с настоящим изобретением для – предпочтительно комбинированного – лечения пролиферативного заболевания, выбранного из группы заболеваний: ГКК, рак головного мозга, рак почки, рак поджелудочной железы, рак толстой или прямой кишки и лейкоз.

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: 300.

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 (li), или слитого с антителом (или встроенный в последовательность), таким как, например, антителом, специфичным к дендритным клеткам.

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 заболеваний, включающих раковые заболевания и аутоиммунные / воспалительные / иммунопатологические заболевания.

Настоящее изобретение далее относится к антителам к пептидам в соответствии с настоящим изобретением или комплексам указанных пептидов в соответствии с настоящим изобретением и МНС и способам их получения.

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

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

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

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

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

Настоящее изобретение далее относится к способу в соответствии с настоящим изобретением, где антигенпрезентирующая клетка включает вектор экспрессии, способный экспрессировать или экспрессирующий указанный пептид, содержащий последовательности с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 300, предпочтительно содержащий последовательности с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No. 124 и с SEQ ID No. 187 по SEQ ID No. 218 или вариантную аминокислотную последовательность.

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

включающий аминокислотную последовательность в соответствии с настоящим изобретением.

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

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

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

Настоящее изобретение далее относится к способу применения в соответствии с настоящим изобретением, где указанные раковые клетки являются клетками ГМК, рака головного мозга, рака почек, рака поджелудочной железы, рака толстой или прямой кишки или лейкоза и, предпочтительно, клетками ГМК.

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 ГМК.

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

Существуют два класса молекул МНС, МНС I класса и МНС II класса. Молекулы МНС состоят из альфа-тяжелой цепи и бета-2-микроглобулина (рецепторы МНС I класса) или альфа- и бета-цепи (рецепторы МНС II класса), соответственно. Их трехмерная форма образует связывающую бороздку, которая используется для нековалентного взаимодействия с пептидами. Молекулы МНС I класса встречаются на большинстве клеток, имеющих ядро. Они презентируют пептиды, образующиеся при протеолитическом расщеплении преимущественно эндогенных белков, дефектных рибосомных продуктов (DRIP) и более крупных пептидов. 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 во время эндоцитоза и впоследствии процессируются. Комплексы пептида и молекул МНС I класса распознаются CD8-положительными Т-клетками, несущими подходящий ТКР (Т-клеточный рецептор), 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), чрезвычайно важна для разработки фармацевтических препаратов для инициации противоопухолевых иммунных ответов (Gnjatic S, et al. Survey of naturally occurring CD4+ T cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: correlation with antibody responses. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jul 22;100(15):8862-7). В области опухоли Т-хелперные клетки поддерживают благоприятное для цитотоксических Т-клеток (ЦТЛ) цитокиновое окружение (Mortara L, et al. CIITA-induced MHC class II expression in mammary

adenocarcinoma leads to a Th1 polarization of the tumor microenvironment, tumor rejection, and specific antitumor memory. Clin Cancer Res. 2006 Jun 1;12(11 Pt 1):3435-43) и привлекают эффекторные клетки, к примеру, ЦТЛ, естественные киллерные клетки (НК), макрофаги, гранулоциты (Hwang ML, et al. Cognate memory CD4+ T cells generated with dendritic cell priming influence the expansion, trafficking, and differentiation of secondary CD8+ T cells and enhance tumor control. J Immunol. 2007 Nov 1;179(9):5829-38).

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 клетки опухоли раковых пациентов экспрессируют молекулы МНС II класса (Dengjel J, et al. Unexpected abundance of HLA class II presented peptides in primary renal cell carcinomas. Clin Cancer Res. 2006 Jul 15;12(14 Pt 1):4163-70).

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, инициирующие ответы Т-хелперных клеток типа TH1, поддерживают эффекторные функции CD8-положительных киллерных Т-клеток, которые включают цитотоксические функции, направленные против опухолевых клеток, проявляющих комплексы опухолеассоциированный пептид / МНС на их клеточной поверхности. Таким образом, опухолеассоциированные пептидные эпитопы Т-хелперных клеток, одни или в комбинации с другими опухолеассоциированными пептидами, могут служить в качестве активных фармацевтических ингредиентов вакцинных композиций, которые стимулируют противоопухолевые иммунные ответы.

На моделях млекопитающих животных, например, мышах, было показано, что даже при отсутствии CD8-положительных Т-лимфоцитов, CD4-положительных Т-клеток

достаточно для ослабления клинических проявлений опухолей посредством ингибирования ангиогенеза при секреции интерферон-гамма (IFN γ).

Имеются свидетельства того, что CD4 Т-клетки являются прямыми противоопухолевыми эффекторами (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 считалось невозможным. Тем не менее, Dengjel с соавторами удалось идентифицировать ряд эпитопов MHC II класса непосредственно из опухолей (WO 2007/028574, EP 1 760 088 B1).

Антигены, которые распознаются специфическими цитотоксическими Т-лимфоцитами опухоли, 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.

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

Для того чтобы пептид MHC I класса инициировал (вызывал) клеточный иммунный ответ, он также должен связываться с молекулой MHC. Этот процесс зависит от аллеля молекулы MHC и специфических полиморфизмов аминокислотной последовательности пептида. Пептиды, связывающиеся с MHC I класса, как правило, имеют 8-12 аминокислотных остатков в длину и обычно содержат два

консервативных остатка («якори») в их последовательности, которые взаимодействуют с соответствующей связывающей бороздкой молекулы 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).

Современная классификация опухолеассоциированных антигенов 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 или NY-ESO-1.

б) Антигены дифференциации: данные ТАА встречаются в опухолевых и нормальных тканях, из которых образуется опухоль; большинство из них 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) Экспрессированные в избытке 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 релевантны только для определенной опухоли, на которой они были идентифицированы, и обычно не являются общими для многих отдельных опухолей. Опухолевая специфичность (или ассоциация) пептида может также возникнуть, если пептид образован из опухолевого (опухоль-ассоциированного) экзона в случае белков с опухоль-специфическими (-ассоциированными) изоформами.

д) ТАА, образующиеся в результате аномальных 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 человеческой папилломы типа 16, Е6 и Е7, которые экспрессированы в карциноме шейки матки.

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

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 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 ТКР и антител в соответствии с изобретением иммуногенность базовых пептидов является второстепенной. Для ТКР и антител в соответствии с изобретением определяющим фактором является презентация.

Как терапевтические, так диагностические способы применения против других видов раковых заболеваний раскрыты в последующем более подробном описании белков (полипептидов), лежащих в основе пептидов в соответствии с изобретением.

О дифференцированной экспрессии COL18A1 сообщалось для рака [мочевого] пузыря, рабдоидных опухолей и карциномы яичника и, как было показано, специфические полиморфизмы гена увеличивают риск развития спорадического рака молочной железы (Fang et al., 2013; Gadd et al., 2010; Peters et al., 2005; Lourenco et al., 2006).

Изменения экспрессии гена COPA и редактирование РНК, как было показано, ассоциируются с гепатоцеллюлярной карциномой, и в экспериментальном исследовании было обнаружено антиапоптотическое воздействие COPA в мезотелиомных клетках (Sudo et al., 2010; Qi et al., 2014; Wong et al., 2003).

Как было показано, активность CPB2 существенно понижена при остром промиелоцитарном лейкозе (Meijers et al., 2000).

CRP, белок острой фазы, синтезируемый в печени, как было показано, является прогностическим маркером различных видов рака, помимо прочих, почечно-клеточной карциномы и множественной миеломы (Ljungberg, 2007; Fassas and Tricot, 2004).

CRYZ является геном-мишенью супрессора опухоли p53 (Bansal et al., 2011). Кодированный им белок зета-кристаллин, как было показано, непосредственно взаимодействует с мРНК антиапоптотической молекулы bcl-2 и стабилизирует избыточную экспрессию bcl-2 при Т-клеточном лимфобластном лейкозе (Larucci et al., 2010).

Избыточная экспрессия CSRP2 ассоциируется с дедифференциацией гепатоклеточной карциномы (Midorikawa et al., 2002).

CYP5A кодирует фермент, который детоксифицирует канцерогенные молекулы и является прогностическим фактором для рака поджелудочной железы (Blanke et al., 2014; Giovannetti et al., 2014).

Повышенные уровни экспрессии CYP27A1 ассоциируются с карциномой эндометрия, раком молочной железы и колоректальным раком (Bergada et al., 2014; Nelson et al., 2013; Matusiak and Benya, 2007).

Об избыточной экспрессии CYP2E1 сообщалось при колоректальном раке, специфические полиморфизмы ассоциируются с раком мочевого пузыря и легких и в клетках рака молочной железы (Ye et al., 2014; Patel et al., 2014; Deng et al., 2014; Leung et al., 2013).

CYP2J2 является ферментом, который, как было продемонстрировано, экспрессируется в избытке в различных видах опухолей человека, включая рак пищевода, легких, молочной железы, желудка, печени и толстой кишки (Jiang et al., 2005; Narjoz et al., 2014).

Высокий уровень экспрессии CYP4F8 был продемонстрирован при раке предстательной железы (Vainio et al., 2011). CYP4F2 и CYP4F3, как было показано, оба избыточно экспрессируются при протоковой аденокарциноме поджелудочной железы, а CYP4F2 в отдельности – при раке яичника (Gandhi et al., 2013; Alexanian et al., 2012).

Было продемонстрировано, что экспрессия CYP4F11 регулируется NF-κB и p53 (Kalsotra et al., 2004; Bell and Strobel, 2012; Goldstein et al., 2013).

Генетические варианты CYP12 имеют значимую ассоциацию с ответом на гемцитабин у пациентов с раком поджелудочной железы (Goldstein et al., 2013; Harris et al., 2014).

Высокие уровни DAP3 коррелируют, с одной стороны, с лучшими ответами на химиотерапию при раке желудка и более благоприятным клиническим исходом при раке молочной железы, однако, с другой стороны, об избыточной экспрессии DAP3 сообщалось для онкоцитарных опухолей щитовидной железы и инвазивной глиобластомы (Jia et al., 2014; Wazir et al., 2012; Jacques et al., 2009; Mariani et al., 2001).

PEX19 необходим для пероксисомного биогенеза, но, как было продемонстрировано, также непосредственно взаимодействует с p19ARF, в конечном итоге, приводя к удержанию этого фактора в цитоплазме и инактивации опухоль-супрессорной функции p53 (Sugihara et al., 2001).

DDX11, принадлежащий к семейству DEAH ДНК-хеликаз, экспрессируется на высоком уровне при распространенной форме меланомы (Bhattacharya et al., 2012).

NME4 является нуклеозид-дифосфаткиназой, избыточно экспрессируемой при раке толстой кишки и желудка, а также при миелодиспластическом синдроме, ассоциируясь в последнем случае с неблагоприятным прогнозом (Krasnarova et al., 2008; Seifert et al., 2005).

DENND5B действует в качестве фактора обмена ГДФ на ГТФ для активации Rab-ГТФаз (Yoshimura et al., 2010).

DIEXF, как было показано, опосредует не-протеасомную деградацию опухолевого супрессора p53 (Tao et al., 2013).

DOCK7 – это фактор обмена гуанин-нуклеотидов, который, как было показано, экспрессируется в избытке клетками глиобластомы и повышает инвазивность клеток глиобластомы в ответ на фактор роста гепатоцитов (HGF), активируя Rac-1 (Murray et al., 2014).

В клеточных линиях гепатоклеточной карциномы, как было продемонстрировано, уровень DRG2 понижается во время апоптоза, индуцированного химиотерапевтическими препаратами, а избыточная экспрессия DRG2 ингибирует в этих клетках апоптоз, вызываемый доксорубицином (Chen et al., 2012a).

DROSHA, один из двух важнейших ферментов для синтеза микроРНК, избыточно экспрессируется в клетках нескольких видов рака, в том числе гастроинтестинальных опухолей, рака молочной железы и рака шейки матки и, по-видимому, усиливает пролиферацию, образование колоний и миграцию опухолевых клеток (Avery-Kiejda et al., 2014; Havens et al., 2014; Zhou et al., 2013b).

Однонуклеотидные полиморфизмы в гене DUSP14 ассоциируются с изменением риска возникновения меланомы (Yang et al., 2014a; Liu et al., 2013b).

В исследовании по полноэкзомному секвенированию были выявлены соматические мутации внутри гена DYNC1H1 у пациентов с интрадуктальными папиллярными муцинозными опухолями поджелудочной железы (Furukawa et al., 2011).

Белок EEF2, как было показано, экспрессируется в избытке клетками рака легких, пищевода, поджелудочной железы, молочной железы и предстательной железы, мультиформной глиобластомы и неходжкинской лимфомы и играет онкогенную роль в росте раковых клеток (Oji et al., 2014; Zhu et al., 2014a).

Мутации гена EFR3A были выявлены в образцах колоректальной аденомы (Bojjireddy et al., 2014; Zhou et al., 2013a).

EIF2B5 кодирует одну субъединицу фактора В инициации трансляции. Однонуклеотидные полиморфизмы этого гена, как было описано, ассоциируются со сроком жизни при раке яичника (Goode et al., 2010).

EIF3A, эукариотический фактор инициации трансляции 3, субъединица А избыточно экспрессируется при раке молочной железы, легкого, шейки матки, пищевода, желудка и толстой кишки и, как было показано, он задействован в регуляции клеточного цикла (Dong and Zhang, 2006).

EIF4E – это сильный онкоген, его уровень повышен в клетках вплоть до 30% злокачественных заболеваний человека, включая карциномы молочной железы, предстательной железы, легких, головы и шеи, а также при многих видах лейкоза и лимфом (Carroll and Borden, 2013).

ELOVL2, как было продемонстрировано, избыточно экспрессируется при гепатоклеточной карциноме (Jakobsson et al., 2006; Zekri et al., 2012).

EPRS кодирует многофункциональную аминоксил-тРНК-синтетазу, о которой сообщалось, что она является опухолеассоциированным антигеном при раке толстой кишки (Line et al., 2002).

Промоторная активность EXOSC4 повышена при гепатоклеточной карциноме в связи с гипометилированием ДНК. EXOSC4 эффективно и специфично ингибирует рост раковых клеток и инвазивный потенциал клеток (Drazkowska et al., 2013; Stefanska et al., 2014).

Гидролитический фермент FUCA2, как было обнаружено, необходим для адгезии *H. pylori* к клеткам рака желудка человека (Liu et al., 2009a).

GABRQ кодирует субъединицу тета рецептора ГАМК типа А. Как было продемонстрировано, ГАМК стимулирует рост гепатоклеточной карциномы за счет избыточной экспрессии субъединицы тета рецептора ГАМК типа А (Li et al., 2012).

Сообщалось, что избыточная экспрессия GALNT2 клетками плоскоклеточной карциномы усиливает инвазивный потенциал опухолевых клеток за счет модификации О-гликозилирования и активности EGFR (Lin et al., 2014; Hua et al., 2012a; Wu et al., 2011).

Высокие уровни GGN ассоциировались с резистентностью клеток к антифолатам, в частности, метотрексату, и неблагоприятным прогнозом при инвазивном раке молочной железы и эндокринных опухолях легких (Schneider and Ryan, 2006; Shubbar et al., 2013; He et al., 2004).

GLUL экспрессируется в избытке в клетках карциномы молочной железы и в астроцитомах человека (Zhuang et al., 2011; Collins et al., 1997; Christa et al., 1994; Cadoret et al., 2002).

О GNPAT сообщалось, что он задействован в ингибировании роста и индукции апоптоза при метастатической меланоме (Ofman et al., 2001; Qin et al., 2013).

О наличии делеций на участке хромосомы GOLGA4 сообщалось для карциномы шейки матки и о гибридной мРНК без сдвига рамки считывания в результате слияния генов GOLGA4 с PDGFRB при злокачественных миелопролиферативных заболеваниях (Senchenko et al., 2003; Hidalgo-Curtis et al., 2010).

GPAM экспрессируется в раковых клетках молочной железы человека, что ассоциируется с изменениями в клеточном метаболизме и лучшей общей выживаемостью (Brockmoller et al., 2012).

Сообщалось, что высокие уровни GPT в сыворотке повышают риск возникновения гастроинтестинального рака и ассоциируются с онкогенезом и рецидивами при вызванной вирусом гепатита С гепатоклеточной карциноме (Kunutsor et al., 2014; Tarao et al., 1997; Tarao et al., 1999).

Уровень GRB14, как было показано, повышен при раке молочной железы, где высокий уровень экспрессии имел значимую ассоциацию с лучшей выживаемостью без признаков заболевания и общей выживаемостью (Huang et al., 2013; Balogh et al., 2012).

Сообщалось, что однонуклеотидные полиморфизмы гена GTF2H4 повышают риск развития связанного с курением рака легких и рака шейки матки, вызываемого вирусом папилломы (Mydlikova et al., 2010; Buch et al., 2012; Wang et al., 2010).

Различные исследования позволяют предположить, что HSPA2 играет важную роль в прогрессии рака шейки матки, почечно-клеточной карциномы и рака мочевого пузыря. Полиморфизмы этого гена ассоциируются с развитием рака желудка (Singh and Suri, 2014; Ferrer-Ferrer et al., 2013; Garg et al., 2010a; Garg et al., 2010b).

HSPA8, как было показано, избыточно экспрессируется при плоскоклеточной карциноме пищевода. Кроме того, HSPA8 экспрессируется в избытке при множественной миеломе и карциноме толстой кишки, и индуцированная BCR-ABL1 экспрессия HSPA8 способствует выживаемости клеток при хроническом миелоидном лейкозе (Dadkhah et al., 2013; Wang et al., 2013a; Chatterjee et al., 2013; Kubota et al., 2010; Jose-Eneriz et al., 2008).

Мутирующий при раке молочной железы люминального типа B, MDN1 описывали в качестве кандидата в гены-супрессоры опухоли (Cornen et al., 2014).

Сообщалось о пониженном уровне MIA3, также известного как белок 1, отвечающий за транспорт и организацию комплекса Гольджи (TANGO), в карциноме толстой

кишки и гепатоклеточной карциноме, а также о его роли в качестве супрессора опухоли при этих заболеваниях (Arndt and Bosserhoff, 2007). Напротив, исследование плоскоклеточной карциномы полости рта указывает на ассоциацию экспрессии MIA3 с прогрессией опухоли, образованием метастазов и клинической стадией, указывая на канцерогенное действие MIA3 (Sasahira et al., 2014).

CPSF6 был идентифицирован в качестве одного гена внутри «кассеты готовых к экспрессии генов», ассоциированного со значимыми различиями метастатического и инвазивного потенциала нескольких видов опухолей, таких как рак молочной железы, толстой кишки, печени, легких, пищевода и щитовидной железы (Yu et al., 2008).

Низкие уровни экспрессии MPDZ, как сообщалось, ассоциируются с неблагоприятным прогнозом для пациентов с раком молочной железы (Martin et al., 2004).

NAA35, также известный как MAK10, кодирует N(альфа)-ацетилтрансферазу 35, вспомогательную субъединицу NatC. У пациентов с плоскоклеточной карциномой пищевода была обнаружена химерная РНК GOLM1-MAK10, в большом количестве содержащаяся в опухолевых клетках, которая кодирует секретлируемый слитый белок, потенциально пригодный в качестве молекулярного маркера (Zhang et al., 2013b).

NAV2, как было показано, специфически экспрессируется в группе раковых заболеваний толстой кишки, и воздействие на раковые клетки толстой кишки антисмысловыми олигонуклеотидами NAV2 вызывало апоптоз (Ishiguro et al., 2002).

Избыточная экспрессия NCSTN является признаком худшей общей выживаемости для пациентов с эстроген-рецептор-негативным раком молочной железы, и высокие уровни никастрина и Notch4 были обнаружены в раковых клетках молочной железы,

резистентных к эндокринной терапии, где их активация, в конечном итоге, ведет к инвазивному поведению (Sarajlic et al., 2014; Lombardo et al., 2014).

В клетках немелкоклеточного рака легких уровень белка NKD1 понижен, коррелируя с повышенным инвазивным потенциалом и неблагоприятным прогнозом, а уровень мРНК NKD1 повышен (Zhang et al., 2011). Уровень мРНК NKD1, как было установлено, повышен в клетках опухолей толстой кишки человека (Yan et al., 2001; Zhang et al., 2011).

Для рака пищевода сообщалось, что NUDC ассоциируется с узловыми метастазами, причем избыточная экспрессия NUDC в раковых клетках предстательной железы приводит к блокировке клеточного деления (Hatakeyama et al., 2006; Lin et al., 2004).

В исследовании, занимающемся изучением роли сигнального пути Notch при раке яичника, сообщалось о более высокой частоте экспрессии RFNG при аденоме по сравнению с карциномой (Gu et al., 2012; Hopfer et al., 2005).

RINT1 описывают как онкоген при мультиформной глиобластоме и как умеренно пенетрантный ген предрасположенности к раку, замеченный при раке молочной железы, а также при раковых заболеваниях, связанных с синдромом Линча (Ngeow and Eng, 2014; Quayle et al., 2012).

Высокие уровни экспрессии RORC, как было обнаружено, ассоциируются с более долгим периодом выживаемости без метастазов при раке молочной железы. Ослабленная экспрессия RORC в клетках соматотропных аденом ассоциируется с увеличенным размером опухоли и ослабленным клиническим ответом на лечение соматостатином (Cadenas et al., 2014; Lekva et al., 2013).

Сообщалось, что RPL17 способствует мультилекарственной резистентности, подавляя вызываемый лекарственными средствами апоптоз (Shi et al., 2004b).

О повышенной экспрессии RPS29 сообщалось для рака желудка и колоректального рака (Takemasa et al., 2012; Sun et al., 2005).

SAMM50 кодирует компонент механизма сортировки и сборки (SAM) внешней митохондриальной мембраны, который задействован во встраивании белков типа бета-бочонка во внешнюю митохондриальную мембрану. Способствующая росту химерная мРНК (SAMM50-PARVB) была обнаружена в раковых клетках молочной железы и яичника и в ряде образцов раковых опухолей молочной железы, желудка, толстой кишки, почки и матки (Plebani et al., 2012).

SERPINF2 кодирует основной ингибитор плазмина, который расщепляет фибрин и различные другие белки. Уровень в плазме ингибиторного комплекса плазмин-альфа 2-плазмин, как было показано, является прогностическим фактором выживаемости при немелкоклеточной карциноме легких, а низкая активность альфа-2-антиплазмина наблюдалась в крови пациентов с карциномой предстательной железы (Zietek et al., 1996; Taguchi et al., 1996).

Избыточная экспрессия SF3B3 значимо коррелирует с общей выживаемостью и резистентностью к эндокринной терапии в случае эстроген-рецептор-положительного рака молочной железы (Gokmen-Polar et al., 2014).

Уровень белка SHC1 повышен при раке предстательной железы, метастатическом раке молочной железы, раке яичника и щитовидной железы в различных изоформах и, как считается, он выполняет функцию первичного адаптерного белка в передаче митогенных сигналов стероидов на негеномном уровне (Alam et al., 2009; Rajendran et al., 2010).

AMACR используется в качестве биомаркера при раке предстательной железы, поскольку он экспрессируется с большим избытком при этом заболевании (Wu et

al., 2014). Кроме того, он используется в качестве иммуногистохимического маркера для постановки диагноза почечно-клеточной карциномы (Ross et al., 2012).

Экспериментальные данные позволяют предположить, что экспрессия C1QTNF3 может играть роль в опухолевом росте остеосаркомы, что связано с активацией сигнального пути ERK1/2, и что этот белок является новым антиапоптотическим адипокином, который защищает мезенхимальные стволовые клетки от гипоксии/апоптоза, вызванного истощением сыворотки за счет сигнального пути PI3K/Akt (Hou et al., 2014; Akiyama et al., 2009).

GPC3 экспрессируется большинством гепатоклеточных карцином. Два терапевтических подхода для лечения ГКК, мишенями которых является GPC3, проходят сейчас клинические испытания фазы II: гуманизированное моноклональное антитело GPC3 и вакцина, состоящая из двух образованных из GPC3 пептидов. Пептиды, применяемые в упомянутом последнем исследовании, отличаются от пептидов, представленных в настоящем документе. Экспрессия GPC3 была также обнаружена во всех опухолях желточного мешка, некоторых плоскоклеточных карциномах легких и светлоклеточных карциномах яичника (Filmus and Capurro, 2013; Kandil and Cooper, 2009).

MAGEB2 классифицируется как раково-тестикулярный антиген, поскольку он экспрессируется в семеннике и плаценте и в значительном спектре опухолей различных гистологических типов, среди прочих, клетками множественной миеломы и плоскоклеточной карциномы головы и шеи (Pattani et al., 2012; van et al., 2011).

MAPKAPK5 кодирует опухолевый супрессор и член семейства серин/треонинкиназ. MAPKAPK5, как было показано, слабо экспрессируется при колоректальном раке, приводя к повышенной активности онкогенного белка тус, и снижает канцерогенез за счет подавления онкогенной активности гена gas в модели гемопозитического рака мыши (Yoshizuka et al., 2012; Kress et al., 2011).

Избыточная экспрессия USP14 ассоциируется с повышенной пролиферацией опухолевых клеток и неблагоприятным прогнозом при эпителиальном раке яичника, немелкоклеточном раке легких и колоректальном раке (Wang et al., 2015; Wu et al., 2013a; Shinji et al., 2006).

C4A описывали в качестве биомаркера синдрома поликистозных яичников и рака эндометрия, а экспериментальные данные позволяют предположить, что C4 может опосредовать раковый рост (Galazis et al., 2013; Rutkowski et al., 2010).

Сообщалось, что CAPZB избыточно экспрессируется клетками папиллома-вирус (18 типа)-положительной плоскоклеточной карциномы полости рта человека и был идентифицирован в качестве локуса предрасположенности к раку предстательной железы (Lo et al., 2007; Nwosu et al., 2001).

Однонуклеотидные полиморфизмы гена CFHR5 ассоциируются с бессобытийной выживаемостью при фолликулярной лимфоме (Charbonneau et al., 2012).

CLIP1 кодирует линкерный белок 1, содержащий домен CAP-GLY, который связывает эндоцитозные пузырьки с микротрубочками. Этот ген экспрессируется в высокой степени клетками Рид-Штернберга при болезни Ходжкина и раке молочной железы и, по-видимому, задействован в миграции и инвазии раковых клеток молочной железы и поджелудочной железы (Sun et al., 2013; Suzuki and Takahashi, 2008; Li et al., 2014a; Sun et al., 2012).

CLU, возможно, ингибирует опухолевую прогрессию, тогда как в случае распространенной неоплазии он может представлять собой значительное преимущество для опухоли, подавляя множество терапевтических факторов стресса и усиливая метастазирование. CLU, как было показано, играет важнейшую роль в патогенезе рака предстательной железы, регулирует агрессивное поведение клеток светлоклеточной гепатоклеточной карциномы, модулируя

сигнальный путь ERK1/2 и экспрессию MMP-9, и придает резистентность к лечению на поздних стадиях рака легких (Toumakos, 2013; Panico et al., 2009; Takeuchi et al., 2014; Wang et al., 2014).

Об этом гибридном гене SEC16A-NOTCH1 сообщалось как о первом рекуррентном гибридном гене рака молочной железы (Edwards and Howarth, 2012).

Рекуррентная делеция гена SHQ1 наблюдалась при раке предстательной железы и шейки матки, что указывает на роль SHQ1 как гена-супрессора опухоли (Krohn et al., 2013; Lando et al., 2013).

В светлоклеточных почечноклеточных карциномах и раке мочевого пузыря высокая экспрессия SLC16A1 ассоциируется с неблагоприятными прогностическими факторами и предсказывает прогрессию опухоли. При колоректальном раке однонуклеотидные полиморфизмы гена SLC16A1 могут влиять на клинические исходы и могут использоваться для предсказания ответа на адьювантную терапию (Kim et al., 2015; Fei et al., 2014a; Fei et al., 2014a).

Как было показано, в глиобластоме высвобождаются высокие уровни глутамата, что, возможно, стимулирует пролиферацию опухолевых клеток и способствует опухолевой инвазии, и уменьшается уровень SLC1A2, что коррелирует с более высокой степенью злокачественности опухоли, указывая на его потенциальную роль в прогрессии глиальной опухоли. Кроме того, гибридный ген SLC1A2 с CD44 был обнаружен при раке желудка, и он может представлять класс гибридных генов, которые устанавливают про-онкогенную метаболическую среду, благоприятствующую росту и сохранению опухоли (Tao et al., 2011; de Groot et al., 2005).

Высокие уровни экспрессии SLC3A2 ассоциируются с ростом опухоли, биологической агрессивностью и выживаемостью пациентов с раковым заболеванием желчевыводящих путей и вносят значительный вклад в

неблагоприятный прогноз для пациентов с немелкоклеточным раком легких, способствуя клеточной пролиферации посредством сигнального пути PI3K/Akt. Кроме того, избыточная экспрессия SLC3A2 вместе с интегрином $\beta 1$, интегрином $\beta 3$ и Fak ассоциируется с прогрессией и развитием метастазов в печени при колоректальном раке (Kaiga et al., 2014; Fei et al., 2014b; Sun et al., 2014).

Свидетельства об участии SLC9A3R1 в развитии ракового заболевания представлены для гепатоклеточной карциномы, шванномы, глиобластомы, колоректального рака и особенно для рака молочной железы (Saponaro et al., 2014).

Сообщалось, что NFYC способствует экспрессии онкогенов в клетках рака желудка и предстательной железы (Zhang et al., 2014a; Gong et al., 2013).

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

TIMM17A экспрессируется в избытке в клетках 21T рака молочной железы, и экспрессия мРНК в раковых тканях молочной железы коррелировала с прогрессией опухоли (Xu et al., 2010).

TMEM209 широко экспрессируется в клетках рака легких (Fujitomo et al., 2012).

TNK2, также известный как тирозинкиназа AСК1, активируется, амплифицируется или мутирует в широком спектре раковых заболеваний человека. Дерегулированная киназа обладает онкогенными свойствами, и ее активация коррелирует с прогрессией до метастатической стадии. Ингибиторы АСК1 продемонстрировали перспективность в доклинических исследованиях (Mahajan and Mahajan, 2013).

TRIM55 кодирует белок с доменами RING и «zinc finger», который временно ассоциируется с микротрубочками, миозином и титином во время сборки

саркомеров мышц, и он задействован также в передаче сигналов из саркомера в ядро (Pizon et al., 2002).

РНК-интерференция белка Ufd1 может сенсibiliзировать гидроксикамптотецин-резистентную раковую клеточную линию толстой кишки SW1116/HCPT с образованием гидроксил-камптотецина (Chen et al., 2011a; Chen et al., 2011c).

При колоректальном раке ген UGT1A1 подавлен посредством метилирования и, таким образом, рассматривается в качестве мишени для исследования резистентности к препарату иринотекан (CPT-11) и механизмов контроля для преодоления лекарственной резистентности (Xie et al., 2014).

UGT1A10 экспрессируется в ткани желудка и желчевыводящих путей (Strassburg et al., 1997), и его избыточная экспрессия существенно увеличивала цитотоксичность противоопухолевого препарата 5-диметиламинопропиламино-8-гидрокситриазолоакридинон C-1305 (Pawlowska et al., 2013). Кроме того, UGT1A10 катализирует глюкоронидацию ксенобиотиков, мутагенов и активных метаболитов и, таким образом, выступает в роли косвенного антиоксиданта. Элементы ответа на ксенобиотик (XRE) и на антиоксидант (ARE) были обнаружены в промоторах UGT1A8, UGT1A9 и UGT1A10 (Kalthoff et al., 2010).

UGT1A8 экспрессируется, в первую очередь, в желудочно-кишечном тракте (Gregory et al., 2003), и экспрессия мРНК повышается при лечении химиопрофилактическим препаратом сульфорафаном (SFN) (Wang et al., 2012).

Гаплотип UGT1A7 ассоциируется с повышенным риском развития гепатоклеточной карциномы у носителей инфекции вируса гепатита В (Kong et al., 2008).

UGT1A6 избыточно экспрессируется клетками рака молочной железы, резистентными к метотрексату (de Almagro et al., 2011), и индуцируется β -

нафтофлавоном, предполагаемым химиопрофилактическим препаратом (Hanioka et al., 2012).

UGT1A9, в основном, экспрессируется в печени и почках (Gregory et al., 2003). Полиморфизм гена UGT1A9 зародышевой линии является потенциальными прогностическим фактором для рецидива рака предстательной железы после простатэктомии (Laverdiere et al., 2014).

Полиморфизм промоторной и кодирующей области UGT1A4 приводит к вариабельности глюкоронидации анастрозола, ингибитора ароматазы, у пациентов с раком молочной железы (Edavana et al., 2013).

UPF1 является частью механизма нонсенс-опосредованной деградации мРНК (NMD) и может играть функциональную роль в процессах прогрессии и метастазирования рака предстательной железы (Yang et al., 2013). Более того, надзорный ген РНК UPF1, как правило, имеет мутацию при аденосквамозной карциноме поджелудочной железы (Liu et al., 2014).

UQCRB является субъединицей митохондриального комплекса III. Ингибирование UQCRB в опухолевых клетках подавляет вызванный гипоксией ангиогенез опухоли (Jung et al., 2013). Два однонуклеотидных полиморфизма в 3'-нетранслируемой области UQCRB являются кандидатами в прогностические маркеры колоректального рака (Lascorz et al., 2012).

Изменения количества копий USO1 коррелировали с дифференциальной экспрессией генов в поверхностно-распространяющейся меланоме в сравнении с узловой меланомой (Rose et al., 2011).

Значимое снижение уровня белковой экспрессии как USP10, так и SIRT6, было обнаружено при раковых заболеваниях толстой кишки человека (Lin et al., 2013).

UTP18 также изменяет трансляцию, способствуя росту и устойчивости к стрессу, и зачастую избыточно экспрессируется при раке (Yang et al., 2014b).

Полиморфизм VARS rs2074511 был ассоциирован с выживаемостью у пациентов с трижды негативным раком молочной железы и, таким образом, может рассматриваться в качестве прогностического фактора для выживаемости у пациентов с раком молочной железы на ранних стадиях (Chae et al., 2011).

VMP1, индуцируемый стрессом белок, ассоциированный с аутофагией, также индуцируется онкогеном KRAS (Lo Re et al., 2012). VMP1 экспрессируется в избытке клетками плохо дифференцированного рака поджелудочной железы человека в ответ на химиотерапевтические средства (Gilabert et al., 2013). Существенное снижение концентрации VMP1 было обнаружено в тканях ГКК человека, и оно сильно коррелировало с многочисленными опухолевыми узлами, отсутствием капсульного образования, венозной инвазией и неблагоприятным прогнозом для ГКК (Guo et al., 2012).

WDR26 защищает клетки миокарда от окислительного стресса (Feng et al., 2012).

ZC3H7A является частью семейства белков CCHH с доменом «zinc finger», известных как регуляторы активации макрофагов (Liang et al., 2008). ZC3H7A, как было обнаружено, имеет более высокие частоты аллелей функциональных мутаций при метастатической опухоли протоковой аденокарциномы поджелудочной железы (Zhou et al., 2012).

FASN – это синтаза жирной кислоты, и она задействована в усиленном липидном синтезе при различных видах рака, в том числе при раке молочной железы, поджелудочной железы, предстательной железы, печени, яичника, толстой кишки и раке эндометрия (Wu et al., 2014; Zhao et al., 2013).

Уровень FGG повышен в клетках гепатоклеточной карциномы, а также рака предстательной железы, легких и молочной железы (Vejda et al., 2002; Zhu et al., 2009).

FMO5 – это монооксигеназа, которая является доминантным специфическим для печени белком FMO, и его концентрация повышена при эстроген-альфа-рецептор-позитивных опухолях молочной железы (Bieche et al., 2004; Zhang and Cashman, 2006).

Содержание мРНК HADHA понижается в ходе дедифференциации ГКК (Tanaka et al., 2013) и в эстроген-рецептор альфа-негативных опухолях молочной железы (Mamtani and Kulkarni, 2012).

Генетические вариации гена HAL, возможно, играют роль в развитии рака кожи (Welsh et al., 2008).

HLTF является членом семейства SWI/SNF транскрипционных регуляторов с геликазной и E3-убиквитинлигазной активностью и было обнаружено, что он инактивирован за счет гиперметилирования в опухолях толстой кишки, желудка, матки, мочевого пузыря и легких (Debauve et al., 2008; Castro et al., 2010; Garcia-Baquero et al., 2014).

HDAC10 – это гистондеацетилаза и транскрипционный регулятор. Экспрессия HDAC10 была значимо понижена в тканях рака желудка по сравнению с прилегающими тканями (Jin et al., 2014). Уровень HDAC10 обратно связан с метастазами в лимфатические узлы у пациентов (человека) с плоскоклеточной карциномой шейки матки (Song et al., 2013). HDAC10 гиперметилирован при злокачественных опухолях надпочечников (Fonseca et al., 2012). Уровни HDAC10 повышены при хроническом лимфоцитарном лейкозе (Wang et al., 2011). Полиморфизм промотора HDAC10-589C>T имел значимую ассоциацию с возникновением ГКК среди пациентов с хроническим гепатитом В, а также с

ускорением прогрессирования ГКК среди пациентов с хроническим гепатитом В (Park et al., 2007). Снижение экспрессии генов гистондеацетилазы II класса ассоциируется с неблагоприятным прогнозом для пациентов с раком легких (Osada et al., 2004).

Низкая экспрессия HIP1R тесно ассоциируется с неблагоприятным исходом для пациентов с диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомой (Wong et al., 2014).

NM13 – это сигнальная пептидная пептидаза, влияющая на жизнеспособность клеток при колоректальной аденоме (Sillars-Hardebol et al., 2012).

Уровни HPR в сыворотке у пациентов с злокачественной лимфомой были значительно выше, чем в контрольных группах без заболевания, и экспрессия HPR повышалась по мере прогрессирования заболевания (Eipelbaum et al., 1998). Экспрессия HPR увеличивалась параллельно с ростом злокачественного потенциала при раке молочной железы, и HPR-положительные виды рака молочной железы, с большей вероятностью рецидивируют после первичной резекции и ассоциируются с более короткими периодами выживаемости без признаков заболевания (Shurbaji et al., 1991).

Вариант (rs932335) гена HSD11B1 ассоциируется с колоректальным раком и раком молочной железы (Feigelson et al., 2008; Wang et al., 2013b).

Экспрессия HSD17B6 в тканях пациентов с раком предстательной железы, получающих антиандрогенную терапию (ADT), была значительно выше, чем в тканях не подвергавшихся лечению пациентов (Ishizaki et al., 2013).

HSPE1 – это митохондриальный шаперонин с функциями в сворачивании белков и передаче сигналов в клетках (NF-каппаВ и сигнальные пути WNT). Повышенные уровни Hsp10 были обнаружены в опухолевых клетках при раке толстой кишки,

экзоцервикальном раке, раке предстательной железы, лимфоме из клеток мантийной зоны и серозном раке яичника. При исследовании бронхиальном канцерогенеза сообщалось о пониженных уровнях Hsp10 (David et al., 2013).

Ксенотрансплантаты карциномы яичника, трансплантированные в бока «голых» мышей и обработанные паклитакселем, демонстрировали пониженную экспрессию ID1 по сравнению с необработанным ксенотрансплантатом (Bani et al., 2004).

IGFBPL1 является регулятором инсулиновых факторов роста и его уровень понижен в клеточных линиях рака молочной железы вследствие aberrантного гиперметилирования. Метилирование гена IGFBPL1 было четко ассоциировано с худшей общей выживаемостью и выживаемостью без признаков заболевания (Smith et al., 2007).

Андроген-чувствительный белок, ассоциированный с микросомами, ИКВКАР модулировал экспрессию эпителиальных и нейрональных маркеров рака предстательной железы, ослаблял пролиферацию за счет механизма, зависящего от андрогенных рецепторов, и участвовал в регулировании опосредованной андрогенным рецептором транскрипции в клеточной линии аденокарциномы предстательной железы LNCaP (Martinez et al., 2011).

INTS8 является частью панели маркеров, которые различают ткани карциномы желудка от прилегающих нераковых тканей (Cheng et al., 2013).

Образованный из IRS2 пептид pIRS-21097-1105 презентировался на клетках меланомы и карцином молочной железы, яичника и колоректальных карцином типа HLA-A2(+) (Zarling et al., 2014). Генотип DD и D-аллель гена IRS-2 1057 были значимо ассоциированы с риском заболевания ЖКК (Rashad et al., 2014).

ITGA7 является альфа-субъединицей димера интегрин альфа-7/бета-1 - рецептора ламинина-1. ITGA7 – это ген-супрессор опухоли, который является

критическим для подавления роста злокачественных опухолей. Анализ мутаций обнаружил мутации *ITGA7* при раке предстательной железы, гепатоклеточной карциноме, лейомиосаркоме мягких тканей и мультиформной глиобластоме. Уровень *ITGA7* был понижен при неметастатическом раке предстательной железы и лейомиосаркоме (Tan et al., 2013).

Уровень *ITIN4* был понижен в нескольких опухолевых тканях, включая толстую кишку, желудок, яичник, легкие, почки, прямую кишку и предстательную железу (Hamm et al., 2008). Низкие уровни *ITIN4* в сыворотке ассоциировались с более коротким сроком выживаемости у пациентов с ГМК, ассоциированной с вирусом гепатита В (Noh et al., 2014). Значительное повышение концентрации *ITIN4* в сыворотке наблюдалось при раке молочной железы, и сывороточные уровни *ITIN4* существенно снижались после хирургической операции (van, I et al., 2010).

Миссенс-мутация была обнаружена в гене *SHKBP1*, который действует по нисходящей от тирозинкиназного рецептора *FLT3*, который имеет мутации в 30% случаев ОМЛ (Greif et al., 2011). *SHKBP1* является одним из потенциальных белков-кандидатов в биомаркеры для классификации хорошо дифференцированных нейроэндокринных опухолей тонкой кишки (WD-SI-NETs) на различных стадиях заболевания (Darmanis et al., 2013).

Уровень экспрессии *KLB* повышен в тканях ГМК по сравнению с соответствующими неопухолевыми тканями (Poh et al., 2012).

Полиморфизм *LBP* rs2232596 ассоциируется со значительно повышенным риском заболевания колоректальным раком у народности хань в Китае (Chen et al., 2011b). *LBP* является кандидатом в сывороточные биомаркеры при карциноме яичника (Boylan et al., 2010). Уровень *LBP* у пациентов с мелкоклеточной карциномой легких был существенно понижен после лечения химиотерапией (Staal-van den Brekel AJ et al., 1997).

Экспрессия мРНК LBR была напрямую ассоциирована со степенью злокачественности опухоли и Ноттингемского прогностического индекса при раке молочной железы (Wazir et al., 2013). LBR обильно экспрессируется клетками папиллярной карциномы щитовидной железы, однако недостаток иммуногистохимической активности можно объяснить аномальным фолдингом белка, что может быть также связано с аномальным фолдингом ядерной мембраны (Recupero et al., 2010).

Сообщалось о дерегуляции LEPR в различных злокачественных клетках, включая рак толстой кишки, гепатоклеточную карциному, рак эндометрия, рак щитовидной железы, рак молочной железы и легких (Ntikoudi et al., 2014; Surmacz, 2013; Uddin et al., 2011).

Однонуклеотидные полиморфизмы гена LIG1 ассоциируются с риском возникновения рака легких, рака эндометрия и глиомы (Doherty et al., 2011; Lee et al., 2008; Liu et al., 2009b).

Экспрессия LRPPRC в тканях рака желудка значительно выше, чем в спаренных образцах контрольной ткани (Li et al., 2014b). Уровни LRPPRC служат в качестве прогностических маркеров для пациентов с аденокарциномами предстательной железы (PCA), и пациенты с высокими уровнями LRPPRC выживают в течение более короткого периода времени после хирургической операции, чем пациенты с низкими уровнями LRPPRC (Jiang et al., 2014). LRPPRC обильно экспрессируется в различных видах опухолей, таких как аденокарцинома легких, плоскоклеточная карцинома пищевода, аденокарцинома желудка, толстой кишки, молочной железы и эндометрия и лимфома (Tian et al., 2012).

Экспрессия MANEA регулируется андрогенами в раковых клетках предстательной железы (Romanuik et al., 2009).

OPLAN экспрессируется в нормальных и опухолевых тканях легких, молочной железы, почек, толстой кишки и яичника, и уровни OPLAN значительно выше в нормальных образцах, чем в опухолях для отдельных пациентов (Srivenugopal and Ali-Osman, 1997).

Гликоформы ORM2 предоставляют ценную информацию о дифференциации между первичным и вторичным раком печени (Mackiewicz and Mackiewicz, 1995). Уровни ORM2 в плазме, как было подтверждено, значительно повышены у пациентов, страдающих колоректальной карциномой, в сравнении с контрольными образцами (Zhang et al., 2012). Уровни фукозилированной гликоформы ORM2 были значительно выше в случаях аденокарциномы легких в сравнении с контролем (Ahn et al., 2014). ORM2 – это предполагаемый биомаркер для ранней диагностики холангиокарциномы (Rucksaken et al., 2012).

Повышенный уровень тетрагидробиоптерина приводит к усилению активности PAH и увеличению уровня белка PAH в клетках гепатомы человека (McGuire, 1991).

PARP14 экспрессируется на высоком уровне плазматическими клетками миеломы и ассоциируются с прогрессией заболевания и плохой выживаемостью. PARP14 имеет важнейшую функцию в JNK2-зависимой выживаемости. PARP14, как было установлено, способствует выживаемости клеток миеломы за счет связывания и ингибирования JNK1 (Barbarulo et al., 2013).

Уровни PC повышены в клетках опухолей печени и рака легких (Chang and Morris, 1973; Fan et al., 2009).

Повышенные уровни PCNT и centrosомных отклонений были описаны в различных гематологических злокачественных заболеваниях и солидных опухолях, включая ОМЛ, ХМЛ, лимфому из клеток мантийной зоны, рак молочной железы и предстательной железы (Delaval and Doxsey, 2010).

PIGN – это ген-супрессор хромосомной нестабильности (CIN) при раке, который часто подвержен потере числа копий при CIN(+) колоректальном раке (Burrell et al., 2013).

Экспрессия PIPOX варьировалась в соответствии с подтипом рака молочной железы, причем опухоли типа HER-2 демонстрировали повышенную экспрессию, а подтип трижды негативного рака молочной железы демонстрировал пониженную экспрессию. PIPOX-негативные опухоли были ассоциированы с более короткими сроками выживаемости без признаков заболевания (Yoon et al., 2014). Уровень PIPOX был понижен при опухолях предстательной железы и снижал канцерогенный потенциал клеток предстательной железы за счет метаболизации саркозина (Khan et al., 2013).

Повышенные уровни PSMD4 были обнаружены в клетках рака толстой кишки, миеломы и гепатоклеточной карциномы (Arlt et al., 2009; Midorikawa et al., 2002; Shaughnessy, Jr. et al., 2011).

Уровень PLIN2 значительно повышен у пациентов со светлоклеточной и папиллярной почечно-клеточной карциномой в сравнении с пациентами контрольной группы. Концентрация PLIN2 в моче до операции отражает размер и стадию опухоли (Morrissey et al., 2014). Экспрессия PLIN2 значительно выше в образцах аденокарциномы легких, чем в нормальных тканях и тканях плоскоклеточных карцином легких (Zhang et al., 2014b).

При раковых заболеваниях человека PLK4 часто подвергается перегруппировке или происходит его потеря с наиболее высокой долей – при гепатоклеточных карциномах, но и также при колоректальном раке, раке головы и шеи (Swallow et al., 2005). PLK4 экспрессируется в избытке при раке молочной железы (Marina and Saavedra, 2014).

QARS является членом семейства аминоксил-тРНК синтетаз (ARS) и нагружает тРНК глутамином. Экспрессия и полиморфизмы ARS ассоциируются с раком молочной железы и глиобластомой (He et al., 2014b; Kim et al., 2012).

Метилированный ген PMF1 является диагностическим и прогностическим биомаркером для пациентов с раком мочевого пузыря (Kandimalla et al., 2013).

Несколько видов опухолей и гематологических злокачественных заболеваний человека вызывают повышение уровня PON2, включая рак щитовидной железы, предстательной железы, поджелудочной железы, семенника, эндометрия/матки, печени и почек, лимфоидные ткани, опухоли мочевого пузыря, ОЛЛ и ХМЛ, и такая избыточная экспрессия вызывала резистентность к различным химиотерапевтическим средствам (иматиниб, доксокубицин, стауроспорин или актиномицин) (Witte et al., 2011).

PRKAR2A является регуляторной субъединицей протеинкиназы A. PRKAR2A значительно повышал выживаемость линий раковых клеток предстательной железы, обработанных таксолом и таксотером (Zynda et al., 2014). PRKAR2A избыточно экспрессируется в клетках аденокарциномы легких (Bidkhorji et al., 2013).

PRPF6 является компонентом комплекса сплайсеосомы tri-snRNP (малый рибонуклеопротеин), который способствует пролиферации клеток рака толстой кишки за счет избирательного сплайсинга генов, ассоциированных с регуляцией роста (Adler et al., 2014). PRPF6 избыточно экспрессируется в клетках аденокарциномы легких (Bidkhorji et al., 2013).

Уровень PSMC4 существенно и когерентно повышен в клетках карциномы предстательной железы по сравнению с соответствующей прилегающей нормальной тканью предстательной железы (Hellwinkel et al., 2011).

Экспрессия QPRT повышается со степенью злокачественности при глиоме и при рецидивирующей глиобластоме – после химиолучевой терапии, экспрессия QPRT ассоциируется с неблагоприятным прогнозом (Sahm et al., 2013). QPRT является потенциальным маркером для иммуногистохимического скрининга фолликулярных узлов щитовидной железы (Hinsch et al., 2009).

RABGGTB избыточно экспрессируется клетками рефрактерной к химиотерапии диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (Linderoth et al., 2008).

RAD21 избыточно экспрессируется клетками гастроинтестинальных опухолей, колоректальной карциномы, распространенного рака эндометрия, рака предстательной железы и молочной железы (Atienza et al., 2005; Deb et al., 2014; Porkka et al., 2004; Supernat et al., 2012; Xu et al., 2014).

RAD23B играет потенциальную роль в прогрессии рака молочной железы (Linge et al., 2014). Однонуклеотидный полиморфизм RAD23B rs1805329 имел значимую ассоциацию с развитием и рецидивами ГЖК у пациентов из Японии с вирусным гепатитом С (Tomoda et al., 2012).

RASAL2 является белком, активирующим RAS-ГТФазу, с функциями супрессора опухоли при эстроген-рецептор-положительном раке молочной железы, раке яичника и легких (Li and Li, 2014; Huang et al., 2014). Напротив, RASAL2 является онкогенным при трижды негативном раке молочной железы и способствует инвазии в мезенхиму и метастазированию (Feng et al., 2014a).

Истощение RNMT эффективно и специфично ингибирует рост раковых клеток и инвазивную способность клеток при различных видах рака, включая рак печени (Stefanska et al., 2014).

О избыточной экспрессии ROCK1 или мутациях гена ROCK1, которые ведут к повышению киназной активности, сообщалось для нескольких видов рака, включая рак легких, карциному желудка, ХМЛ и ОМЛ (Rath and Olson, 2012).

RPL10A является геном-мишенью c-Myc и, возможно, участвует в трансформации гепатоцитов (Huneecke et al., 2012).

Точки разрыва Inv(3) и t(3;3), которые ассоциируются с особенно неблагоприятным прогнозом при миелоидном лейкозе или миелодисплазии, группируются в области, которая расположена в центромерном участке за геном RPN1 (Wieser, 2002).

RRBP1 избыточно экспрессируется раковыми клетками легких и молочной железы (Telikicherla et al., 2012; Tsai et al., 2013).

Уровень экспрессии SCFD1 повышен при язвенном гастрите, который связан с карциномой желудка (Galamb et al., 2008).

ABCB1 кодирует Р-гликопротеин (P-gp), который экспрессируется в нормальных клетках различных органов, таких как кишечник, печень, почки, головной мозг и плацента. Избыточная экспрессия P-gp и генетические полиморфизмы были обнаружены в клетках колоректальной карциномы, опухолей, образованных из надпочечной железы, рака легких и ОЛЛ (Zhang et al., 2013a; Fojo et al., 1987; Gervasini et al., 2006; Jamroziak et al., 2004).

ABCB10 кодирует транспортер ABC подсемейства В (MDR/TAP). ABCB10, как было продемонстрировано, задействован в развитии устойчивости к цисплатину клеточной линии KCP-4 эпидермоидной карциномы человека (Oiso et al., 2014).

Уровень экспрессии ABCB11, как было показано, повышен в клетках протоковой аденокарциномы поджелудочной железы, одном из наиболее устойчивых к лекарственным средствам раковых заболеваний. Таким образом, он может вносить

свой вклад в, как правило, плохой ответ на лечение этого вида рака (Mohelnikova-Duchonova et al., 2013).

Повышенный уровень экспрессии ABCС2 в клетках первичных карцином маточных труб ассоциируется с неблагоприятным прогнозом (Halon et al., 2013).

Уровень ABCС6 понижен при колоректальном раке у пациентов, не отвечающих на паллиативную химиотерапию (Hlavata et al., 2012). Напротив, его уровень повышен в гемцитабин-резистентных клеточных линиях НМРЛ А549 человека (Ikeda et al., 2011).

Экспрессия ACACA, как было показано, была повышена в клетках многочисленных видов рака человека, таких как карцинома молочной железы, предстательной железы и печени, что коррелировало с повышенным липогенезом, инициируемым раковыми клетками. Различные ингибиторы ACACA показали терапевтическую эффективность при обработке раковых клеточных линий, подавляя клеточную пролиферацию и индуцируя клеточную гибель посредством апоптоза (Zu et al., 2013).

ACLY aberrантно экспрессируется клетками различных опухолей, таких как рак молочной железы, печени, толстой кишки, легких и предстательной железы, и коррелирует обратно коррелирует со стадией и дифференциацией опухоли (Zu et al., 2012).

ACSL3 избыточно экспрессируется в раковых клетках легких и, исходя из доклинических исследований, является многообещающей новой терапевтической мишенью при раке легких (Pei et al., 2013). Повышенный уровень экспрессии ACSL3 может служить в качестве потенциального биомаркера риска возникновения эстроген-зависимого рака молочной железы (Wang et al., 2013c).

ACSL4 избыточно экспрессируется клетками эстроген-рецептор негативных опухолей молочной железы и андроген рецептор негативных опухолей молочной железы и опухолей предстательной железы. Потеря чувствительности к стероидным гормонам ассоциировалась с индукцией экспрессии ACSL4 (Monaco et al., 2010). Первоначальное повышение уровня ACSL4 наблюдалось во время трансформации аденомы в аденокарциному (Cao et al., 2001).

Метилирование ACSS3, как было обнаружено, ассоциировалось, по меньшей мере, с одним из классических факторов риска, а именно возрастом, стадией или статусом гена MYCN при нейробластоме (Decock et al., 2012).

Делеция ADSSL1 часто наблюдалась при индуцированных канцерогеном первичных аденокарциномах легких у мышей, в клеточных линиях аденокарцином легких мышей и человека и ассоциировалась с расширенной хромосомной нестабильностью фенотипа при первичных опухолях легких мышей (Miller et al., 2009).

AGFG2 был идентифицирован в качестве одного из 14 прогностических генов-кандидатов, указывающих на случаи, когда гормон-рецептор-негативные или трижды негативные типы рака молочной железы, имеют большую вероятность протекать без развития метастатического рецидива (Yau et al., 2010).

AGT является очень сильным антиангиогенным фактором, который, как было показано, оказывает противоопухолевое воздействие *in vitro* и *in vivo* (Bouquet et al., 2006). У трансгенных мышей избыточная экспрессия человеческого гена AGT, как было показано, снижает ангиогенез и, таким образом, замедляет прогрессию опухоли при гепатокарциноме (Vincent et al., 2009).

AKR1C4 кодирует члена C4 семейства 1 альдокеторедуктаз человека и катализирует восстановление ретинальдегида до ретинола (Ruiz et al., 2011). Таким образом, истощение ретинальдегида сокращает биосинтез ретиноевой кислоты, за

чем следует блокада сигнального пути ретиноидов, который способствует опухолевой прогрессии (Tang and Gudas, 2011; Ruiz et al., 2012)

Как было продемонстрировано, экспрессия ALDH1L1 понижена в ГКК и глиомах. Пониженные уровни ALDH1L1 при этих видах рака ассоциировались с более неблагоприятным прогнозом и более агрессивным фенотипом (Rodriguez et al., 2008; Chen et al., 2012b)

Экспрессия ALG3, как было показано, была более интенсивной в клетках плоскоклеточной карциномы пищевода и рака шейки матки (Shi et al., 2014; Choi et al., 2007). При плоскоклеточной карциноме пищевода повышенный уровень экспрессии ALG3 коррелировал с метастазами в лимфатические узлы (Shi et al., 2014).

ANKS1A был идентифицирован как новая мишень семейства киназ Src, о которых известно, что они участвуют в развитии некоторых видов колоректального рака (Emaduddin et al., 2008).

APOA1 кодирует аполипопротеин A-I, основной белковый компонент липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) в плазме. На многочисленных опухолевых моделях животных была продемонстрирована роль APOA1 в качестве сильного иммуномодулятора при онкогенезе и было показано, что он подавляет рост опухоли и метастазирование, поддерживая процессы врожденного и приобретенного иммунитета (Zamanian-Daryoush et al., 2013).

Уровень APOA2, как было показано, значительно понижен у пациентов с раком поджелудочной железы (Honda et al., 2012). Напротив, повышенный уровень экспрессии APOA2 ассоциировался с ГКК (Liu et al., 2007).

Было обнаружено, что в клетках альфа-фетопротеин-негативной ГКК, связанной с гепатитом В, APOB является одним из 14 дифференциально экспрессируемых

белков, который мог быть ассоциирован с прогрессией ГМК (He et al., 2014a). При распространенном раке молочной железы было обнаружено, что APOB является одним из шести дифференциально экспрессируемых белков, который мог предсказывать ответ на неоадъювантную химиотерапию и безрецидивную выживаемость пациентов (Hyung et al., 2011).

В случае пациентов с колоректальным раком III стадии и клеток меланомы человека AQP9 ассоциировался с повышенной химиорезистентностью (Dou et al., 2013; Gao et al., 2012).

Было показано, что ARG1 является чувствительным и специфичным маркером при различении ГМК от других метастатических опухолей печени (Sang et al., 2013). ARG1 может способствовать локальному подавлению иммунного ответа при НМРЛ (Rotondo et al., 2009).

Уровень фосфорилированной и, таким образом, более активной формы белка ARSB, как было обнаружено, повышен в лейкоцитах периферической крови пациентов с хроническим миелоидным лейкозом в сравнении со здоровыми донорами (Uehara et al., 1983).

В клетках рака яичника пониженный уровень ASNA1, как было продемонстрировано, повышает чувствительность к химиотерапевтическим препаратам: цисплатину, карбоплатину, оксалиплатину и арсениду (Hemmingsson et al., 2009).

Избыточная экспрессия ASPH была продемонстрирована в различных видах рака и линиях раковых клеток (Yang et al., 2010). Иммунизация ASPH-нагруженными дендритными клетками вызывала цитотоксичность против клеток холангиокарциномы *in vitro* и существенно подавляла рост опухоли и метастазы в печени (Noda et al., 2012).

АТР1А2 был обнаружен среди 31 белка, уровень которых значительно повышен при глиобластоме (Com et al., 2012). Напротив, было продемонстрировано, что уровень АТР1А2 понижен при метастатических нейробластомах, инфильтрующих костный мозг (Morandi et al., 2012).

АТР1А3 был обнаружен среди 31 белка, уровень которых значительно повышен при глиобластоме (Com et al., 2012).

АТР6V1С1 может способствовать росту раковой опухоли молочной железы и развитию костных метастазов посредством регуляции активности лизосомальной V-АТФазы. Нокадаун АТР6V1С1 в значительной степени ингибировал рост ксенотрансплантата опухолевых клеток молочной железы мыши линии 4Т1, их метастазирование и остеолитические поражения *in vivo* (Feng et al., 2013). Было показано, что АТР6V1С1 избыточно экспрессируется клетками плоскоклеточной карциномой полости рта и ассоциируется с подвижностью опухолевых клеток (Otero-Rey et al., 2008).

АТР7В ассоциируется с устойчивостью ракового заболевания к цисплатину, широко применяемому противораковому препарату (Dmitriev, 2011).

АХИН2 кодирует белок 2, связанный с аксином (ингибирование аксина), который, предположительно, играет важную роль в регуляции стабильности бета-катенина в сигнальном пути Wnt (Salahshor and Woodgett, 2005). Кроме того, было показано, что АХИН2 подавляет экспрессию онкогена с-МЫС (Rennoll et al., 2014).

При ГКК низкая экспрессия ВААТ ассоциировалась с худшей выживаемостью по сравнению с пациентами с более высоким уровнем экспрессии ВААТ (Furutani et al., 1996).

Сильное снижение числа транскриптов ВНМТ и ВНМТ2 было продемонстрировано для клеток HepG2 и образцов ГКК по сравнению с нормальной тканью печени (Pellanda et al., 2012).

Как было показано, C12orf44 необходим для аутофагии, и он взаимодействует с ULK1 Atg13-зависимым способом (Mercer et al., 2009). Аутофагия играет двойственную роль при раке, выступая как в качестве супрессора опухоли, предотвращающего накопление поврежденных белков и органелл, так и в качестве механизма клеточной выживаемости, который может способствовать росту развившихся опухолей (Yang et al., 2011b).

C17orf70 является компонентом ядерного комплекса анемии Фанкони и необходим для стабильности этого комплекса. Ядерный комплекс анемии Фанкони играет центральную роль в сети ответа на повреждение ДНК. Опосредованный ядерным комплексом анемии Фанкони ответ на повреждение ДНК охватывает генные продукты предрасположенности к раку молочной железы, BRCA1 и BRCA2 (Ling et al., 2007).

C19orf80 кодирует ассоциированный с гепатоклеточной карциномой ген TD26 и, как было показано, является одним из 5 локусов с наиболее высокими уровнями метилирования при ГКК и наиболее низкими – в контрольной ткани (Ammerpohl et al., 2012).

Как было обнаружено, SST7 является частью белковой подсети, являющейся значимо различительным признаком для поздних стадий колоректального рака человека (Nibbe et al., 2009).

Как было показано, CDK6 регулирует активность белка-супрессора опухоли Rb. CDK6 может выполнять свою функцию, способствующую росту опухоли, за счет усиления пролиферации и стимуляции ангиогенеза (Kollmann et al., 2013). Фармакологическое ингибирование CDK6, как было продемонстрировано,

ингибирует дифференциацию роста аномальных лейкозных клеток (Placke et al., 2014).

CFH может играть роль в прогрессии плоскоклеточной карциномы кожи (Riihila et al., 2014). CFH может играть ключевую роль в устойчивости опосредованного комплементом лизиса в различных видах раковых клеток и, как было показано, он избыточно экспрессируется клетками НМРЛ, что ассоциируется с более неблагоприятным прогнозом (Cui et al., 2011).

Инактивирующая мутация CLPTM1 была обнаружена в клетках рака предстательной железы (Rossi et al., 2005).

CMAS кодирует синтетазу цитидин-монофосфат-N-ацетилнейраминовой кислоты, которая катализирует активацию сиаловой кислоты и ее трансформацию в диэфир цитидинмонофосфата. Активированная сиаловая кислота используется для N-гликозилирования, распространенной пост-трансляционной модификации во время клеточной дифференциации. Повышенный уровень экспрессии сахаров сиаловой кислоты на поверхности раковых клеток является одной из хорошо известных характеристик опухоли (Bull et al., 2014).

TF (трансферрин) является одним из наиболее широко применяемых лигандов, нацеленных на опухоль, поскольку рецепторы TF (TFR) экспрессируются в избытке на злокачественных клетках и играют ключевую роль в поглощении клетками железа за счет взаимодействия с TF (Biswas et al., 2013). Предполагалось, что уровень экспрессии рецепторов TFR коррелирует со стадией опухоли или прогрессией рака (Tortorella and Karagiannis, 2014).

TN1L, возможно, играет важную роль в регуляции пролиферации и инвазии при раке молочной железы человека, и он мог бы быть потенциальной мишенью в лечении рака молочной железы человека (Zou et al., 2010).

Гидролиз ТНТРА, возможно, отвечает за антипролиферативное действие Ndrp-1. Как было показано, Ndrp-1 снижает инвазивность и распространение метастазов рака молочной железы, толстой кишки, предстательной железы и поджелудочной железы (Kovacevic et al., 2008).

SMYD3 способствует инвазии рака посредством эпигенетического повышения активности металлопротеиназы MMP-9 (Medjkane et al., 2012). Экспрессия SMYD3 не обнаруживается или она очень слаба во многих видах нормальных тканей человека, тогда как избыточная экспрессия SMYD3 была связана с развитием и прогрессией рака желудка, колоректального рака, гепатоклеточного рака, рака предстательной железы и молочной железы (Hamamoto et al., 2006; Liu et al., 2014; Liu et al., 2013a).

Связь между STAT2 и развитием опухоли наблюдалась у трансгенных мышей без STAT2 (Yue et al., 2015) или конститутивно экспрессирующих IFN- α в головном мозге (Wang et al., 2003).

TACC3 экспрессируется в избытке клетками многих видов рака человека, включая рак яичника, рак молочной железы, плоскоклеточную карциному и лимфому (Ma et al., 2003; Jacquemier et al., 2005; Lauffart et al., 2005).

Также было продемонстрировано, что SPBP подавляет транскрипционную активность рецептора эстрогена α (ER α). Избыточная экспрессия SPBP ингибировала пролиферацию ER α -зависимой клеточной линии рака молочной железы (Gburcik et al., 2005). В клеточном ядре SPBP проявляет относительно низкую подвижность, и он обогащен в областях с повышенным уровнем упаковки хроматина, четко указывая на то, что он является белком, связывающимся с хроматином (Darvekar et al., 2012). TCF20 является важным для усиленной индукции белков, задействованных в программе клеточной защиты от окислительного стресса (Darvekar et al., 2014).

C3 является известным элементом воспалительного микроокружения опухоли (Rutkowski et al., 2010), и активация может стать преимуществом для роста опухоли (Markiewski et al., 2008). Ферментативное расщепление C3 ведет к выработке анафилатоксина C3a, воспалительного медиатора и хемоаттрактанта, и C3b (Sahu et al., 1998).

CLN3 является антиапоптотическим геном в нервных клетках-предшественниках NT2 и в некоторых видах опухолей (Zhu et al., 2014b). Он задействован во внутриклеточном транспорте и регуляции в нервных и ненервных клетках (Rakheja et al., 2008; Getty and Pearce, 2011) и он задействован в нескольких важных сигнальных путях (Persaud-Sawin et al., 2002). мРНК и белок CLN3 избыточно экспрессируются в нескольких видах раковых клеточных линий, включая молочную железу, толстую кишку, злокачественную меланому, предстательную железу, яичник, нейробластому и мультиформную глиобластому, но не клеточные линии рака легких или поджелудочной железы (Rylova et al., 2002).

SLC13A5 является одним из 7 генов-маркеров CIMP. CIMP (фенотип метилирования CpG-островков) светлоклеточных почечно-клеточных карцином (ccRCCs) характеризуется скоплением метилированных ДНК на островках CpG и более неблагоприятным исходом заболевания для пациента (Tian et al., 2014; Arai et al., 2012).

SLC35B2 задействован в согласованной транскрипционной регуляции во время индукции биосинтеза сиалил-сульфо-Lex-гликана во время острого воспаления (Нуораниemi et al., 2004) и в сульфатизации эпитопа 6-сульфолактозамина в человеческой клеточной линии колоректальной карциномы (Kamiyama et al., 2006). Клеточные линии колоректальной карциномы, а также колоректальные ткани человека экспрессируют SLC35B2 (Kamiyama et al., 2011).

Экспрессия PLOD1 ассоциируется с прогрессией рака молочной железы человека (Gilkes et al., 2013).

Уровень PRDX5 повышен во многих злокачественных опухолях (Urig and Becker, 2006), и ингибирование PRDX5 могло предотвратить возникновение и прогрессию опухоли, позволяя предположить, что PRDX5 является многообещающей мишенью для противораковой терапии. Его высоко нуклеофильный и доступный активный сайт селеноцистеина, возможно, будет основной мишенью для разработки лекарственного средства (Liu et al., 2012).

Повышенная экспрессия PSMD8 в на периферии легкого может обладать потенциальной информативностью относительно того, какие основные клеточные популяции задействованы в развитии инвазивных типов рака (Zhou et al., 1996).

SNRPD1 является белком ядра сплайсосомы, уровень которого повышен при злокачественных опухолях.

Пониженный уровень экспрессии SPTBN1 ассоциируется с ухудшением прогноза при раке поджелудочной железы (Jiang et al., 2010).

SQSTM1 действует в качестве сигнального центра для различных путей сигнальной трансдукции, таких как сигнальный путь NF-κB, апоптоз и активация Nrf2, дерегуляция которых ассоциируется с костной болезнью Педжета и развитием опухоли (Komatsu et al., 2012).

Экспрессия PCNA предсказывает выживаемость при злокачественной меланоме аноректальной области (Ben-Izhak et al., 2002). Была идентифицирована ассоциирующаяся с раком изоформа PCNA (caPCNA), которая содержала необычную картину групп метилового эфира на многих остатках глутаминовой и аспарагиновой кислот внутри PCNA (Hoelz et al., 2006).

Истощение SRP54 в нескольких опухолевых клеточных линиях не вызвало явных проявлений клеточных фенотипов, таких как блокировка роста или смерть, даже в

клетках, выбранных по устойчивому снижению содержания компонентов SRP (Ren et al., 2004).

На молекулярном уровне STAT1 ингибирует пролиферацию раковых клеток как мыши, так и человека, обработанных IFN- γ , за счет его способности увеличивать экспрессию ингибитора циклин-зависимой киназы p21Cip1 или снижать экспрессию c-мус (Ramana et al., 2000). Противоопухолевавшая активность STAT1 подтверждается, кроме того, его способностью ингибировать ангиогенез и метастазы опухоли в мышинных моделях (Huang et al., 2002). Повышенные уровни мРНК STAT1, как было показано, являются частью молекулярного портрета, ассоциированного с лучшим прогнозированием относительно метастазирования для пациента с рецептор-негативным статусом в отношении гормонов и трижды негативным раком молочной железы (Yau et al., 2010).

Образцы фолликулярных неоплазий, взятые с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии, демонстрировали избыточную экспрессию STT3A в злокачественных узловых образованиях по сравнению с доброкачественным видом заболевания (Patel et al., 2011).

Мета-анализ показал, что полиморфизм STXBP4/COX11 rs6504950 значимо коррелирует с риском заболевания раком молочной железы (Tang et al., 2012).

Пептид, состоящий или 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.

Настоящее изобретение далее относится к пептиду в соответствии с настоящим изобретением, где указанный пептид модифицирован и(или) включает непептидные связи, как будет описано далее.

Настоящее изобретение далее относится к пептиду 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 к дендритным клеткам, т. е. связывающимся с дендритными клетками.

Настоящее изобретение далее относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей пептид 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 экспрессировать, экспрессирующему и(или) презентирующему 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.

Настоящее изобретение далее относится к антителам, которые будут описаны далее, и способам их получения. Предпочтительными являются антитела, которые являются специфичными к пептидам настоящего изобретения, и(или) к пептидам настоящего изобретения, когда они связаны со своими МНС. Предпочтительные антитела могут быть моноклональными.

Настоящее изобретение далее относится к Т-клеточным рецепторам (ТКР), в частности к растворимым ТКР, мишенями которых являются пептиды в соответствии с настоящим изобретением и(или) их комплексы пептидов и МНС, и способам их получения.

Настоящее изобретение далее относится к антителам или другим связывающим молекулам, мишенью которых являются пептиды в соответствии с настоящим изобретением и(или) их комплексы пептид-МНС, и способам их получения.

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 антиген-презентирующей клеткой. Настоящее изобретение далее относится к клетке-хозяину в соответствии с настоящим изобретением, где антиген-презентирующая клетка является дендритной клеткой.

Настоящее изобретение далее относится к аптамерам. Аптамеры (см., например, заявку WO 2014/191359 и цитируемую в ней литературу) – это короткие одноцепочечные молекулы нуклеиновых кислот или пептидов, 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 неопухолевые 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 проявляют очень хорошую кажущуюся аффинность на наномолярном уровне.

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

Могут быть отобраны аптамеры к сложным мишеням, таким как клетки и ткани и комплексы пептидов, включающих, предпочтительно состоящих из последовательности в соответствии с любой из последовательностей с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 300, 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).

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 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.

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, антитело к CD28. Полипептидные каркасы описываются, к примеру, в разделе уровня техники патентной заявки WO 2014/071978A1 и цитируемой в ней литературе.

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 клетки-хозяина и(или) его культуральной среды.

Настоящее изобретение далее относится к способу получения активированных Т-клеток *in vitro*, причем способ включает контактирование Т-клеток *in vitro* с нагруженными антигеном молекулами человеческого МНС I или II класса, экспрессированными на поверхности подходящей антигенпрезентирующей клетки в течение периода времени, достаточного для активации антиген-специфическим образом указанных Т-клеток, где указанный антиген является по меньшей мере одним пептидом в соответствии с настоящим изобретением. Настоящее изобретение далее относится к способу, 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 настоящим изобретением, где антигенпрезентирующая клетка включает вектор экспрессии, способный экспрессировать указанный пептид, содержащий последовательность с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 300 или его вариантную аминокислотную последовательность.

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

Настоящее изобретение далее относится к способу уничтожения клеток-мишеней у пациента, чьи клетки-мишени aberrантно 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 активированной Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением в качестве медикамента или в производстве медикамента.

Настоящее изобретение далее относится к применению в соответствии с настоящим изобретением, где указанный медикамент является вакциной, клеткой, популяцией клеток, такой как, например, клеточной линией, растворимыми ТКР и моноклональными антителами.

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

Настоящее изобретение далее относится к способу применения в соответствии с настоящим изобретением, где указанные раковые клетки являются клетками ГКК.

Настоящее изобретение далее относится к конкретным белкам-маркерам и биомаркерам, основанным на пептидах в соответствии с настоящим изобретением, которые могут быть использованы при постановке диагноза и(или) составлении прогноза течения ГМК.

Кроме того, настоящее изобретение относится к применению этих новых мишеней для лечения рака.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу получения персонализированной противораковой вакцины для отдельного пациента с использованием банка данных (называемого в настоящем контексте также «хранилищем») предварительно прошедших скрининг опухолиассоциированных пептидов.

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

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

МНС человека называются также человеческими лейкоцитарными антигенами (HLA).

Понятие «пептид» в контексте настоящего описания обозначает серии аминокислотных остатков, связанных друг с другом обычно пептидными связями между альфа-аминными и карбонильными группами смежных аминокислот. Пептиды предпочтительно имеют длину в 9 аминокислот, но могут быть короче – 8 аминокислот в длину, и длиннее – 10, 11, 12 или 13 аминокислот 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 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 «пептиды настоящего изобретения» включает также пептиды, состоящие из или включающие пептид, как определено выше в соответствии с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 300.

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» введён 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 MHC I класса, которые могут экспрессироваться из этих локусов.

Таблица 6: 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 M, et al. HLA gene and haplotype frequencies in the North American population: the National Marrow Donor Program Donor Registry. Transplantation. 1997 Oct 15;64(7):1017-27) 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. (S.J. Chanock, et al (2004) HLA-A, -B, -Cw, -DQA1 and DRB1 in an African American population from Bethesda, USA Human Immunology, 65: 1223-1235).

Аллель	Популяция	Фенотип, вычисленный 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%

Аллель	Популяция	Фенотип, вычисленный по частоте аллеля
DR6	Афроамериканцы (Северная Америка)	33,70%
DR7	Афроамериканцы (Северная Америка)	19,20%
DR8	Афроамериканцы (Северная Америка)	12,10%
DR9	Афроамериканцы (Северная Америка)	5,80%
DR1	Монголоиды (Северная Америка)	6,80%
DR2	Монголоиды (Северная Америка)	33,80%
DR3	Монголоиды (Северная Америка)	9,20%
DR4	Монголоиды (Северная Америка)	28,60%
DR5	Монголоиды (Северная Америка)	30,00%
DR6	Монголоиды (Северная Америка)	25,10%
DR7	Монголоиды (Северная Америка)	13,40%
DR8	Монголоиды (Северная Америка)	12,70%
DR9	Монголоиды (Северная Америка)	18,60%
DR1	Латиноамериканцы (Северная Америка)	15,30%
DR2	Латиноамериканцы (Северная Америка)	21,20%
DR3	Латиноамериканцы (Северная Америка)	15,20%
DR4	Латиноамериканцы (Северная Америка)	36,80%
DR5	Латиноамериканцы (Северная Америка)	20,00%
DR6	Латиноамериканцы (Северная Америка)	31,10%
DR7	Латиноамериканцы (Северная Америка)	20,20%
DR8	Латиноамериканцы (Северная Америка)	18,60%
DR9	Латиноамериканцы (Северная Америка)	2,10%
A*24	Филиппинцы	65%
A*24	Русские ненцы	61%
A*24:02	Япония	59%
A*24	Малайзия	58%
A*24:02	Филиппинцы	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 или A*24. Вакцина также может включать универсальные пептиды, связывающиеся с МНС II класса. Поэтому вакцина по изобретению может применяться для лечения рака у пациентов, которые являются A*02-положительными, A*24-положительными или положительными по A*02 и A*24, причем в связи с универсальной по связыванию природе данных пептидов не нужен подбор аллотипов МНС II класса.

Комбинирование, например, пептидов A*02 и A*24 в одной вакцине имеет то преимущество, что более высокий процент любой популяции пациентов может пройти лечение 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 по изобретению 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.allelefrequencys.net).

Используемая в контексте данного описания ссылка на последовательность ДНК включает как однонитевую, так и двухнитевую ДНК. Таким образом, специфическая последовательность, если в контексте не указано иное, относится к однонитевой ДНК такой последовательности, дуплексу такой последовательности с его комплементом (двухнитевая ДНК) и комплементу такой последовательности. Понятие «кодирующая область» относится к тому участку гена, который в естественных или обычных условиях кодирует продукт экспрессии того гена в его естественном геномном окружении, т. е., участку, кодирующему *in vivo* нативный продукт экспрессии гена.

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

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.

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

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

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

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

(ii) каждая брешь в Контрольной последовательности и

(iii) каждое выровненное основание или аминокислота в Контрольной последовательности, которые отличаются от выровненного основания или аминокислоты в Сравняваемой последовательности, представляют собой различие; и

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

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

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

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, аминокислоты, содержащие нестандартные R-группы (т.е. R-группы, отличающиеся от обнаруженных в повсеместно встречающихся 20 аминокислотах природных белков) 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 замены должны производиться не более чем в 4 позициях внутри пептида одновременно.

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 элонгации в соответствии с изобретением могут быть взяты из

Таблицы 7:

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

С-конец	N-конец
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.

Понятие «Т-клеточный ответ» означает специфическую пролиферацию и активацию эффекторных функций, индуцированных пептидом *in vitro* или *in vivo*. Для ЦТЛ, 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.

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.

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.

Молекулы МНС I класса могут встречаться на большинстве клеток, имеющих ядро, которые презентируют пептиды, образующиеся после протеолитического расщепления преимущественно эндогенных, цитозольных или ядерных белков, 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.

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-положительными Т-клетками (молекула МНС I класса), так и CD4-положительными Т-клетками (молекула МНС II класса) являются важными при разработке противоопухолевых вакцин. Поэтому целью настоящего изобретения является предложить композиции пептидов, которые содержат пептиды, связывающиеся с комплексами МНС любого класса.

Ввиду серьезных побочных эффектов и расходов, связанных с лечением рака, крайне необходимы улучшенные методы прогнозирования и диагностики. Поэтому существует необходимость в идентификации других факторов, играющих роль биомаркеров рака вообще и ГКК в частности. Кроме того, существует необходимость в идентификации факторов, которые могут быть использованы при лечении рака вообще и ГКК в частности.

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

Как было показано, исходный ген/белок (называемый также «белком полной длины» или «базовым белком»), из которого были получены пептиды, был в высокой степени избыточно экспрессирован в клетках рака по сравнению с нормальными тканями – понятие «нормальные ткани» в связи с настоящим изобретением подразумевает здоровые клетки печени 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 ГКК, 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 ГКК, 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, в частности растворимых ТКР, в соответствии с настоящим изобретением (см. Пример 3). Кроме того, пептиды, если находятся в комплексе с соответствующей молекулой МНС, могут быть использованы для получения антител и(или) ТКР, в частности растворимых ТКР, в соответствии с настоящим изобретением. Соответствующие способы хорошо известны специалисту данной области, а также могут быть найдены в соответствующих литературных источниках. 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.

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

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

этансульфоновую кислоту, п-толуолсульфо кислоту, 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).

Особенно предпочтительной является композиция и(или) применение указанной композиции, например, в виде вакцины, включающей пептиды с последовательностью в соответствии с SEQ ID NO 1, 2, 7, 225, 228, 301, 303 и 312 или каркас, реагирующий с пептидами с последовательностью в соответствии с SEQ ID NO 1, 2, 7, 225, 228, 301, 303 и 312, и их комплексы с молекулами МНС.

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 ГЭК, и так как было определено, что данные пептиды не присутствуют или присутствуют в небольшом количестве в нормальных тканях, то эти пептиды могут быть использованы для диагностики наличия рака.

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

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.

Кроме того, еще один аспект настоящего изобретения относится к способу получения указанного антитела, специфически связывающегося с главным

комплексом гистосовместимости человека (МНС) I или II класса в комплексе с HLA-рестриктированным антигеном, причем этот способ включает: иммунизацию генетически модифицированного не являющегося человеком млекопитающего, содержащего клетки, экспрессирующие указанный главный комплекс гистосовместимости человека (МНС) I или II класса с растворимой формой молекулы МНС I или II класса в комплексе с указанным HLA-рестриктированным антигеном; выделение молекул мРНК из продуцирующих антитела клеток указанного не являющегося человеком млекопитающего; получение 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 HLA-рестриктированным антигеном. 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 работе Cohen CJ et al. Recombinant antibodies with MHC-restricted, peptide-specific, T-cell receptor-like specificity: new tools to study antigen presentation and TCR-peptide-MHC interactions. *J Mol Recognit.* 2003 Sep-Oct;16(5):324-32.; Denkberg G, et al. Selective targeting of melanoma and APCs using a recombinant antibody with TCR-like specificity directed toward a melanoma differentiation antigen. *J Immunol.* 2003 Sep 1;171(5):2197-207; and Cohen CJ, et al. Direct phenotypic analysis of human MHC class I antigen presentation: visualization, quantitation, and in situ detection of human viral epitopes using peptide-specific, MHC-restricted human recombinant antibodies. *J Immunol.* 2003 Apr 15; 170(8):4349-61, 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 называется "специфическим" в контексте настоящего изобретения.

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 N, et al. Monoclonal TCR-redirectioned tumor cell killing. Nat Med 2012 Jun;18(6):980-987). В целях стабилизации Т-клеточных рецепторов во время 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 (см. Boulter JM et al. Stable, soluble T-cell receptor molecules for crystallization and therapeutics. Protein Eng 2003 Sep;16(9):707-711.; Card KF, et al. A soluble single-chain T-cell receptor IL-2 fusion protein retains MHC-restricted peptide specificity and IL-2 bioactivity. Cancer Immunol Immunother 2004 Apr;53(4):345-357; and Willcox BE, et al. Production of soluble alphabeta T-cell receptor heterodimers suitable for biophysical analysis of ligand binding. Protein Sci 1999 Nov; 8 (11):2418-2423). 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), доменами, рекрутирующими эффекторные клетки, такими как анти-CD3 домен, и т. д. Более того, он может быть экспрессирован на Т-клетках, используемых для адоптивного переноса. Дополнительную информацию можно найти в патентных заявках WO 2004/033685A1 и WO 2004/074322A1. Комбинация растворимых ТКР описывается в патентной заявке WO 2012/056407A1. Другие способы получения описаны в патентной заявке WO 2013/057586A1.

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

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 (J. Pinheiro, et al. *The nlme Package: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models*. 2007), скорректировав ее для повторных анализов на уровень ложноположительных результатов (Y. Benjamini and Y. Hochberg. *Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing*. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, Vol.57 (No.1):289-300, 1995).

Для идентификации и относительной количественной оценки лигандов HLA с помощью масс-спектрометрического анализа молекулы HLA из подвергнутых шоковой заморозке образцов тканей были очищены и из них выделены HLA-ассоциированные пептиды. Выделенные пептиды были разделены и последовательности были идентифицированы с помощью методов жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (LC-MS) с ионизацией электрораспылением (nanoESI) в режиме реального времени. Полученные пептидные последовательности подтверждали сравнением картины фрагментации природных пептидов TUMAP, записанной на образцах ГКК (N = 16 A*02-положительных образцов, включая тринадцать A*02:01-положительных образцов, N = 15 A*24-положительных образцов), с картинами фрагментации соответствующих синтетических контрольных пептидов с идентичными последовательностями. Поскольку пептиды были идентифицированы непосредственно в качестве лигандов

молекул HLA первичных опухолей, то эти результаты дают прямое доказательство естественного процессирования и презентации идентифицированных пептидов на ткани первичной раковой опухоли, полученной от 31 пациента с ГКК.

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

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

Комплексы HLA-пептид, полученные из образцов ткани ГКК, очищали и HLA-ассоциированные пептиды выделяли и анализировали методом ЖХ-МС (см. примеры). Все TUMAP, содержащиеся в настоящей патентной заявке, были идентифицированы с помощью этого подхода на образцах первичных ГКК, что подтверждает их презентацию на клетках первичной ГКК.

Пептиды TUMAP, идентифицированные на многочисленных образцах ГКК 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.

Настоящее изобретение относится к пептиду, включающему последовательность, которая выбирается из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 300 или их вариант, который по меньшей мере на 90% гомологичен (предпочтительно, если он идентичен) последовательности с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 300, или их варианту, который индуцирует Т-клеточную перекрестную реакцию с указанным пептидом, где указанный пептид не является базовым полипептидом полной длины.

Настоящее изобретение далее относится к пептиду, включающему последовательность, которая выбирается из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 300 или их вариант, который по меньшей мере на 90% гомологичен (предпочтительно, если он идентичен) SEQ ID NO 1 по SEQ ID NO 300, 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: 300.

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 ГМК.

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 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 300 или указанную вариантную аминокислотную последовательность.

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

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

относится к способу применения в соответствии с изобретением, где медикамент проявляет противораковую активность.

Настоящее изобретение далее относится к способу применения в соответствии с изобретением, где указанные раковые клетки являются клетками ГКК или клетками других солидных или гематологических опухолей, таких как рак поджелудочной железы, рак головного мозга, рак почки, толстой кишки или прямой кишки или лейкоза.

Настоящее изобретение далее относится к конкретным белкам-маркерам и биомаркерам, основанным на пептидах в соответствии с настоящим изобретением, в контексте изобретения называемые «мишенями», которые могут быть использованы при постановке диагноза и(или) составлении прогноза течения ГКК. 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 полипептидным маркером ГКК, доставляют токсин к клетке ГКК, экспрессирующей раковый ген-маркер на повышенном уровне и(или) ингибируют активность ракового полипептида-маркера ГКК) в соответствии с настоящим изобретением.

Если возможно, антитела по изобретению могут быть куплены в коммерческих источниках. Антитела по изобретению могут быть также получены при использовании хорошо известных способов. Специалисту будет понятно, что для

генерирования антител по изобретению могут использоваться либо полипептидные-маркеры ГКК 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: 300, 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 ГКК, 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 испытаны 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, Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988; новой 2-е издание 2013 г.). 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 или 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 нечеловеческого вида. На практике гуманизированные антитела являются обычно человеческими антителами, в которых некоторые остатки CDR и, возможно, остатки FR заменены на остатки аналогичных сайтов антител грызунов.

Использоваться могут трансгенные животные (например, мыши), которые способны при 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, внутривнутрибрюшинно, подкожно, внутримышечно) или другими способами, такими как вливание, которое гарантирует доставку к кровотоку эффективным образом. Антитела также могут вводиться внутритуморальными или перитуморальными способами, чтобы вызвать местные, а также и системные терапевтические эффекты. Предпочтительными являются местное или внутривенное введение.

Эффективная дозировка и режим введения антител могут быть определены эмпирически, а принятие 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 дневная дозировка антитела, используемого отдельно, может варьироваться от около 1 мкг/кг вплоть до 100 мг/кг массы тела или более в день, в зависимости от факторов, упоминаемых выше. После введения антитела, предпочтительно для лечения ГМК, эффективность терапевтического антитела 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.

Поскольку пептиды по изобретению, указанные в Таблицах выше, и, таким образом, их базовые полипептиды высоко экспрессированы в клетках ГКК и экспрессированы на достаточно или чрезвычайно низких уровнях в нормальных клетках, ингибирование белка, выбранного из группы, состоящей из белков, являющихся продуктами следующих генов: Предпочтительными для ингибирования и для антител и(или) ТКР являются GLUL, GPAM, PLIN2, SLC16A1, SLC9A3R1, PCBD1, SEC16A, AKR1C4, ABCB11, HAL, CYP2E1, C4A, C4B, ALDH1L1, CRP, ACSL4, EEF2, HLTF, FBXO22, GALK1, TMCO1, TMEM33, ZNF318, IPO9, AMACR, C1QTNF3, CYP4F8, CYP4F3, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F2, MOCOS, A1CF, COL18A1, HPR, LBP, C19orf80, CFHR5, ITIH4, TMEM110, LARP4, LMF2, SLC10A5 и SLC16A11; более предпочтительными для ингибирования и для антител и(или) ТКР являются ANKFY1, C12orf44, C16orf58, CPSF1, DCAF8, PEX19, DDX11, DDX12P, DECR2, NME4, DENND5B, DYM, EDC4, ERI3, FAM20A, FNDC3A, GPR107, GYG2, HEATR2, IFT81, KCTD3, SHKBP1, KIAA1324L, KLHL24, MARCH6, MBTPS2, MIR1279, CPSF6, NOC4L, NXF1, PANK2, PCNXL3, PIPSL, PSMD4, PSMD14, SLC35B1, TCP11L2, THNSL2, THOC2, TOMM5, TRAPPC6B, TRIM54, TRIM55, TRIM63, UGGT2, URB1, VPS54, WIZ, ZNF451, RFTN2, SCFD1, SERINC5, CCT7P2, CMAS, ANKS1A, C17orf70, CCT7, CDK5RAP2, CLPTM1, и наиболее предпочтительными для ингибирования и для антител и(или) ТКР являются APOB, FASN и(или) COPA; экспрессия или активность этих маркеров может быть предпочтительно интегрирована в любую терапевтическую стратегию, например, лечения или профилактики ГКК.

Принцип антисмысловой терапии основан на гипотезе, что последовательность-специфическое подавление генной экспрессии (посредством транскрипции или трансляции) может быть достигнуто при внутриклеточной гибридизации между геномной ДНК или мРНК и комплементарными антисмысловыми соединениями. Образование такого гибридного дуплекса нуклеиновых кислот препятствует транскрипции геномной ДНК, кодирующей опухолевый антиген-мишень, или процессингу/транспорту/трансляции и(или) стабильности мРНК опухолевого антигена-мишени.

Антисмысловые нуклеиновые кислоты могут быть доставлены с использованием различных подходов. Например, антисмысловые олигонуклеотиды или антисмысловая РНК могут вводиться непосредственно (например, внутривенной инъекцией) субъекту в форме, которая позволяет поглощение опухолевыми клетками. Альтернативно в клетки могут вводиться вирусные или плазмидные векторы *in vivo*, которые кодируют антисмысловую РНК (или фрагменты РНК). Антисмысловые эффекты также могут быть вызваны смысловыми последовательностями; однако степень фенотипических изменений крайне изменчива. Фенотипические изменения, индуцированные эффективной антисмысловой терапией, оцениваются в соответствии с изменениями, например, уровнями мРНК-мишени, уровнями белка-мишени и/или уровнями активности белка-мишени.

В конкретном примере ингибирование функции мишени/маркера ГКК с помощью генной терапии с применением антисмысловых конструкций может быть выполнено посредством прямого введения субъекту РНК комплементарной маркерной РНК опухоли. РНК, комплементарную маркерной РНК опухоли, можно получить и выделить с помощью любой стандартной методики, но наиболее просто ее получить с помощью транскрипции *in vitro* с использованием ДНК, комплементарной маркерной ДНК опухоли, под контролем высокоэффективного промотора (например, Т7-промотора). Введение комплементарной маркерной РНК опухоли в клетки может быть произведено любым способом прямого введения нуклеиновых кислот, описываемым ниже.

Альтернативная стратегия ингибирования функции белка, выбранного из группы, состоящей из указанных выше белков и, наиболее предпочтительно, из APOB, FASN и(или) COPA, включает использование нуклеиновой кислоты (например, миРНК или нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело к белку или его участок, которая может быть внесена в раковые клетки или другие клетки, приводя к внутриклеточной экспрессии и секреции антитела), белка или малой молекулы или

любого другого соединения, мишенью которого является экспрессия, трансляция и(или) биологическая функция этого белка.

В методах, описываемых выше, которые включают введение и поглощение экзогенной ДНК в клетках субъекта (т.е. генную трансдукцию или трансфекцию), нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению могут быть в форме «обнаженной» ДНК, или же нуклеиновые кислоты могут быть в векторе для доставки нуклеиновых кислот к клеткам для ингибирования экспрессии белка-маркера ГКК. Вектор может представлять собой имеющийся в продаже препарат, такой как аденовирусный вектор (Quantum Biotechnologies, Inc. (Лаваль, Квебек, Канада). Доставка нуклеиновой кислоты или вектора к клеткам может производиться посредством различных механизмов. Например, доставка может производиться с помощью липосомы с использованием имеющихся в продаже липосомных препаратов, таких как Lipofectin, Lipofectamine (GIBCO-25 BRL, Inc., Гейтерсберг, Мэриленд, США), Superfect (Qiagen, Inc. Хильден, Германия) и Transfectam (Promega Biotec, Inc., Мэдисон, Висконсин, США), в равной степени как и других липосом, разработанных в соответствии со стандартными процедурами уровня техники. Кроме того, нуклеиновая кислота или вектор по изобретению может быть доставлен *in vivo* посредством электропорации, технология которой имеется в наличии в компании Genetronics, Inc. (Сан-Диего, Калифорния, США), в равной степени как и с помощью устройства Sonoporation machine (ImaRx Pharmaceutical Corp., Таксон, Аризона, США).

Одним из примеров является векторная доставка посредством вирусной системы, такой как ретровирусная векторная система, которая способна упаковывать рекомбинантный ретровирусный геном. Рекомбинантный ретровирус может быть затем использован для инфицирования и, таким образом, доставки в инфицированные клетки антисмысловой нуклеиновой кислоты, которая ингибирует экспрессию белка, выбранного из группы, состоящей из указанных выше белков. Точный способ введения измененной нуклеиновой кислоты в клетки млекопитающего, разумеется, не ограничивается использованием ретровирусных

векторов. Имеется широкий спектр других методик для данной процедуры, включая использование аденовирусных векторов, адено-ассоциированных вирусных (AAV) векторов, лентивирусных векторов, псевдотипированных ретровирусных векторов. Также могут применяться методики физической трансдукции, такие как липосомная доставка и рецептор-опосредованные и другие механизмы эндоцитоза. Данное изобретение может быть использовано вместе с любым из этих или других используемых обычно способов генного переноса.

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

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

Как было упомянуто ранее, в настоящем изобретении, таким образом, предложен пептид, включающий последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 300 или ее вариант, который на 90% гомологичен последовательностям с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 300, или их варианту, который будет индуцировать Т-клеточную перекрестную реакцию с указанным пептидом. Пептиды по изобретению обладают способностью связываться с молекулой главного комплекса гистосовместимости человека (МНС) I класса или – удлинённые версии упомянутых пептидов – с МНС II класса.

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

Специалист в данной области будет в состоянии оценить, будут ли Т-клетки, индуцированные вариантом конкретного пептида, способны к перекрестной реакции с самим пептидом (Fong L, et al. Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Jul 17;98(15):8809-14; Zaremba S, et al. Identification of an enhancer agonist cytotoxic

T lymphocyte peptide from human carcinoembryonic antigen. *Cancer Res.* 1997 Oct 15;57(20):4570-7; Colombetti S, et al. Impact of orthologous melan-A peptide immunizations on the anti-self melan-A/HLA-A2 T cell cross-reactivity. *J Immunol.* 2006 Jun 1;176(11):6560-7; Appay V, et al. Decreased specific CD8+ T cell cross-reactivity of antigen recognition following vaccination with Melan-A peptide. *Eur J Immunol.* 2006 Jul;36(7):1805-14).

Под «вариантом» данной аминокислотной последовательности авторы изобретения имеют в виду, что боковые цепи, например, одного или двух аминокислотных остатков, изменены (например, при их замещении боковой цепью другого встречающегося в природе аминокислотного остатка или какой-либо другой боковой цепью), так что пептид по-прежнему способен связываться с молекулой HLA по существу таким же путем, как и пептид, состоящий из данной аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 300. 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 (Godkin A, et al. Use of eluted peptide sequence data to identify the binding characteristics of peptides to the insulin-dependent diabetes susceptibility allele HLA-DQ8 (DQ 3.2). *Int Immunol.* 1997 Jun;9(6):905-11) и банков данных (Rammensee H. et al. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics.* 1999 Nov;50(3-4):213-9), конкретные позиции связывающихся с HLA пептидов обычно являются якорными остатками, формирующими центральную последовательность, подходящую к связывающему мотиву 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: 300, сохраняя известные якорные остатки, и будет в состоянии определить, сохранят ли такие варианты способность связываться с молекулами МНС I или II класса. Варианты по настоящему изобретению сохраняют способность связываться с ТКР активированных Т-клеток, которые могут впоследствии вступать в перекрестную реакцию и уничтожать клетки, экспрессирующие полипептид, который содержит природную аминокислотную последовательность родственного пептида, как определено в аспектах настоящего изобретения.

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

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

Таблица 8: Варианты и мотив пептидов в соответствии с SEQ ID NO: 1, 117 и 246

Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO. 1	V	M	A	P	Ж	T	M	T	I
Варианты									V
									L
									A
		L							V
		L							L
		L							
		L							A
		A							V
		A							L
		A							
		A							A
		V							V
		V							L
		V							
		V							A
		T							V
		T							L
		T							
		T							A
		Q							V
	Q							L	
	Q								
	Q							A	
Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO 246	K	L	I	S	S	Y	Y	N	V
Варианты		I							L
		I							I
		I							
		I							A
		M							L
		M							I
		M							
		M							A
		A							L
		A							I

		A							
		A							A
		V							L
		V							I
		V							
		V							A
		T							L
		T							I
		T							
		T							A
		Q							L
		Q							I
		Q							
		Q							A
Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO. 117	Y	A	F	P	K	S	I	T	V
Варианты									L
									I
									A
		M							L
		M							I
		M							
		M							A
		L							L
		L							I
		L							
		L							A
		V							L
		V							I
		V							
		V							A
		T							L
		T							I
		T							
		T							A
		Q							L
	Q							I	
	Q								
	Q							A	

Более длинные пептиды также могут быть пригодными. Также 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.

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.

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: 300.

«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: 300, или его вариант, содержит дополнительные находящиеся на N- и(или) C-

конце фрагменты последовательности аминокислот, которые не являются обязательно формирующими часть пептида, которая функционирует как эпитоп для молекул МНС.

Тем не менее, эти фрагменты могут быть важны для обеспечения эффективного введения пептида в соответствии с настоящим изобретением в клетки. В одном варианте осуществления настоящего изобретения пептид является частью слитого белка, которая включает, например, 80 N-терминальных аминокислот антиген-ассоциированной инвариантной цепи (р33, в дальнейшем "Ii") HLA-DR, как взятый из банка данных NCBI, инвентарный номер - GenBank Accession-number X00497. В других видах слияния пептиды по настоящему изобретению могут быть слиты с антителом, описанным в настоящем документе, или его функциональной частью, в частности встроены в последовательность антитела, так чтобы быть специфической мишенью указанного антитела, или, например, слиты с или встроены в антитело, являющееся специфическим 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) *J. Immunol.* 159,3230-3237, включенной настоящее описание по ссылке. Этот подход охватывает получение псевдопептидов, которые содержат изменения, охватывающие остов, но не ориентацию боковых цепей. Meziere и соавторы (1997) показывают, что эти псевдопептиды пригодны для связывания с МНС и индукции

ответов Т-хелперных клеток. Ретро-обратные пептиды, которые содержат связи NH-CO вместо пептидных связей CO-NH, намного более устойчивы к протеолизу.

Непептидной связью является, например, $-CH_2-NH$, $-CH_2S-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH=CH-$, $-COCH_2-$, $-CH(OH)CH_2-$ и $-CH_2SO-$. В патенте США № 4 897 445 предлагается метод твердофазного синтеза непептидных связей ($-CH_2-NH$) 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, 2005, которая включена в описание по ссылке. Химическая модификация аминокислот включает, но без ограничения, модификацию с помощью ацилирования, амидинирования, пиридоксилрования 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. Coligan и соавт. (John Wiley & Sons NY 1995-2000) для получения более обширной информации о методах, связанных с химической модификацией белков.

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

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

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

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

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

Пептид или вариант, в котором пептид модифицирован или включает непептидные связи, является предпочтительным вариантом осуществления изобретения. 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 соавторов (Solid-phase peptide synthesis under continuous-flow conditions. Proc Natl Acad Sci U S A. May 1981; 78(5): 2791–2795) и в прилагающихся ссылках. Временная защита N-аминогруппы производится 9-флуоренилметилоксикарбонильной (Fmoc) группой. Повторное расщепление этой высоко щелочлабильной 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-триметилбензолсульфонилла (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-гидроксиметилфеноксисуксусной кислоты. Все аминокислотные производные добавляются в виде предварительно синтезированных симметричных ангидридных производных за исключением аспарагина и глутамина, которые добавляются с применением обратной реакции соединения, опосредованной N, N-дициклогексилкарбодиимид/1-гидроксibenзотриазолом. Все реакции сочетания и снятия защитных групп отслеживались с помощью методов контроля с применением нингидрина, тринитробензолсульфоновой кислоты или изотина. После завершения синтеза

пептиды отщепляются от смолы-носителя с сопутствующим удалением защитных групп боковой цепи при обработке 95% трифторуксусной кислотой, содержащей 50 % смеси поглотителей. Обычно используемые поглотители включают этандитиол, фенол, анизол и воду, окончательный выбор зависит от составляющих аминокислот синтезируемого пептида. Для синтеза пептидов также возможна комбинация твердофазных и жидкофазных методов (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 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.

Желательный способ модификации ДНК, кодирующей полипептид по изобретению, – это использование полимеразной цепной реакции, как раскрыто в работе Saiki RK и соавторов (Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. N Engl J Med. 1988 Sep 1;319(9):537-41). 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, желательна ли поддержка в эписомальной или интеграционной форме.

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

элементами контроля, которая кодирует выбранный признак в трансформированной клетке, такой как устойчивость к антибиотикам.

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

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

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

Типичная клеточная векторная плаزمиды млекопитающих для конститутивной экспрессии включает промотор CMV или SV40 с подходящим концевым участком поли-А и маркером устойчивости, таким как неомицин. Одним примером является pSVL, имеющимся в наличии в компании Pharmacia, Пискатеуэй, Нью-Джерси, США. Примером индуцируемого вектора экспрессии млекопитающих является pMSG, также имеющийся в наличии в Pharmacia. Пригодными плазмидными векторами дрожжей являются pRS403-406 и pRS413-416, и они, как правило, имеются в наличии у компании Stratagene Cloning Systems, Ла Джолла, Калифорния 92037, США. Плазмиды pRS403, pRS404, pRS405 и pRS406 являются дрожжевыми интегрирующими плазмидами (YIps) и включают дрожжевые селективируемые маркеры HIS3, TRP1, LEU2 и URA3. Плазмиды pRS413-416 являются дрожжевыми

плазмидами с центромерами (Υ_{cp}). 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, c-тус или MAT. Данные слитые белки позволяют проводить выявление, очистку и анализ рекомбинантного белка. Слияния с двойной меткой обеспечивают гибкость при выявлении.

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

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

Настоящее изобретение относится также к клетке-хозяину, трансформированной с помощью полинуклеотидной векторной конструкции по настоящему изобретению. Клетка-хозяин может быть как прокариотической, так и эукариотической. Бактериальные клетки могут быть, предпочтительно, прокариотическими клетками-хозяевами при некоторых условиях и обычно являются штаммом *E. coli*, таким как, например, *E. coli* штамма DH5, имеющимся в наличии в Bethesda Research Laboratories Inc., Бетесда, Мэриленд, США, и RR1, имеющимся в наличии в Американской коллекции типовых культур ("American Type Culture Collection" (ATCC), Роквил, Мэриленд, США (№ ATCC 31343). Предпочтительные эукариотические клетки-хозяева включают дрожжи, клетки насекомых и млекопитающих, предпочтительно клетки позвоночных, таких как линии фибробластных клеток и клеток толстой кишки таких видов как мышь, крыса, обезьяна или человек. Дрожжевые клетки-хозяева включают YPH499, YPH500 и YPH501, которые, как правило, имеются в наличии в Stratagene Cloning Systems, Ла Джола, Калифорния 92037, США. Предпочтительные клетки-хозяева млекопитающих включают клетки яичника китайского хомяка (CHO), имеющиеся в наличии в ATCC как CCL61, эмбриональные клетки швейцарской мыши линии NIH/3T3, имеющиеся в наличии в ATCC как CRL 1658, клетки COS-1 из почек обезьяны, имеющиеся в наличии в ATCC как CRL 1650, и клетки 293, являющиеся эмбриональными клетками почек эмбрионов человека. Предпочтительными клетками насекомых являются клетки Sf9, которые могут трансфицироваться с помощью бакуловирусных векторов экспрессии. Обзор в отношении выбора подходящих клеток-хозяев для экспрессии представлен, например, в учебном пособии авторов Paulina Balbás и Argelia Lorence «Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols », часть первая, второе издание, ISBN 978-1-58829-262-9, и другой литературе, известной специалисту данной области.

Трансформация соответствующих клеток-хозяев с помощью ДНК-конструкции по настоящему изобретению производится при помощи хорошо известных способов,

которые обычно зависят от типа используемого вектора. Относительно трансформации прокариотических клеток-хозяев см., например, работу Cohen и соавт. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2110 и Sambrook и соавт. (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Нью-Йорк. Трансформация дрожжевых клеток описывается в работе Sherman и соавт. (1986) Methods In Yeast Genetics, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Нью-Йорк. Также подходит метод Бигса (Beggs) (1978) Nature 275, 104-109. 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 (Sipuleucel-T) (Small EJ, Schellhammer PF, Higano CS, Redfern CH, Nemunaitis JJ, Valone FH, Verjee SS, Jones LA, Hershberg RM.; Placebo-controlled phase 3 trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer; J Clin Oncol. 2006; 24(1):308924; Rini BI, Weinberg V, Fong L, Conry S, Hershberg RM, Small EJ; Combination immunotherapy with prostatic acid phosphatase pulsed antigen-presenting cells (Provenge) plus bevacizumab in patients with serologic progression of prostate cancer after definitive local therapy; Cancer. 2006; 107(1):67-74)

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

В другом варианте осуществления пептид, нуклеиновая кислота или вектор экспрессии по изобретению применяются в медицине. Например, пептид или его вариант может приготавливаться для внутривенного (в/в) введения, подкожного (п/к) введения, внутрикожного (в/к) введения, внутрибрюшинного (в/б) введения, внутримышечного (в/м) введения. Предпочтительные способы введения пептидов включают п/к, в/к, в/б, в/м и в/в. Предпочтительные способы введения ДНК включают в/к, в/м, п/к, в/б и в/в. Вводиться могут, к примеру, дозы от 50 мкг до 1,5 мг, предпочтительно от 125 мкг до 500 мкг пептида или ДНК, в зависимости от соответствующего пептида или ДНК. Дозировка в данных пределах успешно использовалась в проведенных ранее клинических исследованиях (Walter et al Nature Medicine 18, 1254–1261 (2012)).

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 ATCC, 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 Karre и соавт. (Ljunggren, H.-G., and K. Karre. 1985. J. Exp. Med. 162:1745).

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 последовательность с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 300 или их вариантную аминокислотную последовательность.

Для получения Т-клеток *in vitro* могут быть использованы многие другие способы. Например, для получения ЦТЛ используются аутологичные опухоль-инфильтрующие лимфоциты. Plebanski и соавт. (Induction of peptide-specific primary cytotoxic T lymphocyte responses from human peripheral blood. *Eur J Immunol.* 1995 Jun;25(6):1783-7) для получения Т-клеток используют 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 соавторы 2003 (Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T-cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres. *J Immunol.* 2003 Nov 15; 171 (10):4974-8) описывают прайминг Т-клеток *in vitro* с использованием искусственных антигенпрезентирующих клеток (иАПК), который является также подходящим способом генерирования Т-клеток против выбранного пептида. В настоящем изобретении иАПК были получены прикреплением предварительно образованных комплексов МНС-пептид к поверхности полистироловых частиц (микросфер) с помощью биохимического способа с биотином-стрептавидином. Данная система допускает точный контроль плотности МНС на иАПК, который позволяет селективно вызвать высоко- или низкоавидные антигенспецифические Т-клеточные ответы с высокой эффективностью в образцах крови. Кроме комплексов МНС-пептид, иАПК должны нести другие белки с костимуляторной

активностью, такие как антитела к CD28, прикрепленные к их поверхности. Кроме того, такая основанная на иАПК система часто требует добавления соответствующих растворимых факторов, к примеру, цитокинов, таких как интерлейкин-12.

При получении Т-клеток могут быть также использованы аллогенные клетки, и этот способ подробно описывается в патентной заявке WO 97/26328, включенной сюда путем ссылки. Например, кроме клеток дрозодилы и Т2-клеток, для презентации антигенов могут использоваться другие клетки, такие как клетки яичника китайского хомяка (CHO), бакуловирус-инфицированные клетки насекомых, бактерии, дрожжи, инфицированные осповакциной клетки-мишени. Кроме того, могут быть использованы растительные вирусы (см., например, работу Porta и соавт. (1994) Development of cowpea mosaic virus as a high-yielding system for the presentation of foreign peptides. Virology. 1994 Aug 1;202(2):949-55), 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, селективно распознают клетку, которая аберрантно экспрессирует полипептид, включающий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 300.

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 нормальными уровнями экспрессии, или что ген является «молчащим» в ткани, из которой образовалась опухоль, однако он экспрессирован в опухоли. Под понятием «экспрессирован в избытке» авторы изобретения понимают, что полипептид представлен на уровне, который, по меньшей мере, в 1,2 раза выше уровня, представленного в нормальной ткани; предпочтительно, по меньшей мере, в 2 раза

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

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

Протоколы для этого так называемого адоптивного переноса Т-клеток хорошо известны из уровня техники. С обзорами можно ознакомиться в Gattinoni L, et al. Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. Nat Rev Immunol. 2006 May;6(5):383-93. Review. И Morgan RA, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. Science. 2006 Oct 6;314(5796):126-9).

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

Предпочтительно, если медикамент по настоящему изобретению является вакциной. 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. Пептиды могут быть также конъюгированы с подходящим носителем, таким как гемоцианин фиссуреллы (KLH) или маннан (см., например, патентную заявку WO 95/18145). Пептид может быть также меченым или может быть слитым белком или гибридной молекулой. Пептиды, последовательность которых дана в настоящем изобретении, как ожидается, стимулируют CD4+ или CD8+ Т-клетки. Тем не менее, стимуляция CD8 Т-клеток более эффективна в присутствии поддержки, предоставляемой CD4 хелперными Т-клетками. Таким образом, для эпитопов МНС I класса, которые стимулируют CD8 Т-клетки, партнеры в слиянии или участки гибридной молекулы надлежащим образом предоставляют эпитопы, которые стимулируют CD4-положительные Т-клетки. CD4- и CD8-стимулирующие эпитопы хорошо известны из уровня техники и включают те, что были идентифицированы в настоящем изобретении.

В одном аспекте вакцина включает по меньшей мере один пептид, имеющий аминокислотную последовательность с SEQ ID No. 1 по SEQ ID No 300, 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 другом аспекте вакцина включает по меньшей мере один пептид, имеющий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 300, 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.

Полинуклеотид 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 (Pascolo et al., Human peripheral blood mononuclear cells transfected with messenger RNA stimulate antigen-specific cytotoxic T-lymphocytes in vitro. Cell Mol Life Sci. 2005 Aug;62(15):1755-62). Полинуклеотидные вакцины просто получить, однако механизм действия этих векторов по индуцированию иммунного ответа понятен не полностью. Подходящие векторы и системы доставки включают вирусные ДНК и(или) РНК, такие как системы, которые основаны на аденовирусе, вирусе осповакцины, ретровирусах, вирусе герпеса, аденоассоциированном вирусе или гибридах, содержащих элементы более чем одного вируса. Невирусные системы доставки включают катионные липиды и катионные полимеры и хорошо известны из уровня техники в области доставки ДНК. Также может быть использована физическая доставка, такая как посредством «генного пистолета». Пептид или пептиды, кодируемые нуклеиновой кислотой, могут быть слитым белком, например, с эпитопом, который стимулирует Т-клетки против соответствующего противоположного определяющего комплементарность участка CDR, как описывается выше.

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

флагеллин или лиганды TLR5, полученные из флагеллина, лиганд FLT3, ГМ-КСФ, IC30, IC31, имиквимод (ALDARA®), резимиквимод, ImuFact IMP321, интерлейкины, такие как ИЛ-2, ИЛ-13, ИЛ-21, интерферон-альфа или бета или их пегилированные производные, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, иммуностимулирующие комплексы ISCOM, JuvImmune®, LipoVac, MALP2, MF59, монофосфорил липид А, Монтанид IMS 1312, Монтанид ISA 206, Монтанид ISA 50V, Монтанид ISA-51, эмульсии «вода в масле» и «масло в воде», ОК-432, ОМ-174, ОМ-197-МР-ЕС, ОНТАК, OspA, векторную систему RepTel®, основанные на поли-(лактид когликолиде) [PLG] и декстрани микрочастицы, талактоферрин SRL172, вирусомы и другие вирусоподобные частицы, YF-17D, VEGF trap, R848, Бета-глюкан, Pam3Cys, стимулон Aquila QS21, который получают из сапонины, микобактериальные экстракты и синтетические имитаторы бактериальных клеточных стенок и другие запатентованные адъюванты, такие как Detox компании Ribi, Quil или Superfos. Предпочтительными адъювантами являются такие как адъювант Фрейнда или ГМ-КСФ. Несколько иммунологических адъювантов (например, MF59), специфических для дендритных клеток, и их получение были описаны ранее (Allison and Krummel, 1995 The Yin and Yang of T cell costimulation. Science. 1995 Nov 10;270(5238):932-3). 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, IFN-альфа, IFN-бета) (Gabrilovich, 1996 Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells Nat Med. 1996 Oct;2(10):1096-103).

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 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 вирусомы.

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

В предпочтительном варианте осуществления фармацевтической композиции в соответствии с изобретением адъювант выбран из группы, состоящей из колониестимулирующих факторов, таких как гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ, сарграмостим), циклофосфамид, имиквимод и резиквимод. В предпочтительном варианте осуществления фармацевтической композиции в соответствии с изобретением адъювантом является циклофосфамид, имиквимод или резиквимод. Еще более предпочтительными адъювантами являются монтанид IMS 1312, монтанид ISA 206,

монтанид ISA 50V, монтанид ISA-51, поли-ICLC (Hiltonol®) и моноклональные антитела к CD40 или их комбинации.

Эта композиция используется для парентерального введения, такого как подкожное, внутрикожное, внутримышечное или для перорального введения. Для этого пептиды и – необязательно – 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», 3. Ed., 2000, изд. «American Pharmaceutical Association and pharmaceutical press». Композиция может использоваться для предупреждения, профилактики и(или) лечения аденоматозных или раковых заболеваний. Примеры фармацевтических композиций могут быть взяты, например, из EP2112253.

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

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 (vii) шприцев. Контейнер является,

предпочтительно, бутылью, 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, в/к; введение может производиться инфузионным насосом.

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

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

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

В контексте настоящего изобретения термин «хранилище» относится к группе 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 определенно 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 ГКК с различными HLA-A, HLA-B и HLA-C-аллелями. Оно может содержать пептиды, связанные с молекулами МНС I класса и МНС II класса или удлиненные пептиды, связанные с молекулами МНС I класса. Помимо опухолеассоциированных пептидов, собранных из нескольких тканей ГКК, 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 ГКК 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 (ГКК) по сравнению с рядом нормальных органов и тканей применяли анализ экспрессии информационной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) всего генома.
3. Идентифицированные HLA-лиганды сравнивали с данными по экспрессии генов. Пептиды, презентруемые в избытке или селективно презентруемые на опухолевой ткани, предпочтительно кодируемые селективно экспрессированными или экспрессированными в избытке генами, выявленными на этапе 2, считали подходящими TUMAP-кандидатами для мультипептидной вакцины.
4. Было произведено изучение литературы для выявления дополнительных свидетельств, подтверждающих релевантность идентифицированных в качестве TUMAP пептидов.
5. Релевантность избыточной экспрессии на уровне мРНК подтверждали повторным обнаружением выбранных на этапе 3 пептидов TUMAP на опухолевой ткани и отсутствием (или нечастым обнаружением) на здоровых тканях.
6. В целях оценки того, может ли быть осуществима индукция *in vivo* Т-клеточных ответов выбранными пептидами, были проведены анализы иммуногенности *in vitro* при использовании человеческих Т-клеток здоровых доноров, а также пациентов, больных ГКК.

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 была специально разработана исходя из того, что, как ожидается, каждая HLA-A*02 и(или) HLA-A*24-положительная опухоль экспрессирует несколько антигенов и

охватывает несколько независимых сигнальных путей, необходимых для роста и сохранения опухоли. Это независимо обеспечивается для каждой из подгрупп пептидов, специфичных к обоим аллелям HLA I класса (A*02 и A*24), на основе данных экспериментального анализа. 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 одном из аспектов пептиды предварительно прошли скрининг на иммуногенность до их включения в хранилище. В качестве примера, но не для ограничения изобретения, иммуногенность пептидов, включенных в хранилище, определяется способом, включающим прайминг Т-клеток *in vitro* посредством повторных стимуляций CD8+ Т-клеток здоровых доноров клетками, презентующими искусственный антиген, нагруженными комплексами пептид-МНС и антителами к CD28.

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

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

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

Предпочтительно, чтобы пептиды, включенные в вакцину, были идентифицированы способом, включающим: (а) идентификацию опухолеассоциированных пептидов (TUMAP), презентруемых опухолевым образцом отдельного пациента; (б) сравнение идентифицированных на этапе (а) пептидов с хранилищем (банком данных) пептидов, как описано выше; и (в) выбор по меньшей мере одного пептида из хранилища (банка данных), который коррелирует с опухолеассоциированным пептидом, идентифицированным у пациента. Например, пептиды TUMAP, презентруемые опухолевым образцом, идентифицируют с помощью: (а1) сравнения данных по экспрессии в опухолевом образце с данными нормальной ткани, соответствующей типу ткани опухолевого образца, для идентификации белков, которые в опухолевом образце экспрессируются в избытке или 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 (a1) сравнения данных по экспрессии в опухолевом образце с данными нормальной ткани, соответствующей типу ткани опухолевого образца, для идентификации белков, которые в опухолевом образце экспрессируются в избытке или абберрантно; и (a2) установления корреляции между данными экспрессии и последовательностями лигандов МНС, связанных с молекулами МНС I и(или) II класса в опухолевом образце, в целях идентификации лигандов МНС, которые получены из белков, избыточно или абберрантно экспрессируемых опухолью. В качестве другого примера: могут быть идентифицированы белки, имеющие мутации, являющиеся уникальными для опухолевого образца, соотносимого с соответствующей нормальной тканью отдельного пациента, и могут быть идентифицированы пептиды TUMAP, специфической мишенью которых является мутация. Например, геном опухоли и соответствующей нормальной ткани могут быть секвенированы методом полногеномного секвенирования: для обнаружения несинонимичных мутаций на кодирующих белок участках генов геномную ДНК и РНК экстрагируют из опухолевых тканей, а нормальную, не имеющую мутаций геномную ДНК зародышевой линии экстрагируют из мононуклеарных клеток периферической крови (МПК). Применяемый подход секвенирования нового поколения (NGS) заключается в повторном секвенировании кодирующих белок участков (повторное секвенирование 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. Опухольеспецифические 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), презентуемых опухолевым образцом отдельного пациента способами, описанными выше; (б) сравнения пептидов, идентифицированных на этапе (а) с хранилищем пептидов, как описано выше, которые предварительно прошли скрининг на иммуногенность и избыточную презентацию в опухолях по сравнению с соответствующими нормальными тканями; (в) выбора по меньшей мере одного пептида из хранилища, который коррелирует с опухолеассоциированным пептидом, идентифицированным у пациента; и (г) необязательно, выбора по меньшей мере одного пептида, идентифицированного *de novo* на этапе (а) с подтверждением его иммуногенности.

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

После отбора пептидов для персонализированной вакцины на основе пептидов производят вакцину. Вакцина – это предпочтительно жидкая лекарственная форма, состоящая из отдельных пептидов, растворенных в 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.

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

На Фигурах:

На Фигуре 1 представлена избыточная презентация различных пептидов в нормальных тканях (темно-серый цвет) и ГКК (светло-серый). Фигура 1А) АРОВ, пептид: ALVDTLKFV (A*02) (SEQ ID NO: 7), ткани слева направо; 1 жировая ткань, 3 надпочечные железы, 2 артерии, 2 костных мозга, 7 головных мозгов, 3 молочной железы, 13 толстых кишок, 4 пищевода, 2 желчных пузыря, 3 желудочно-кишечных тракта, 3 сердца, 16 почек, 4 образца лейкоцитов, 45 легких, 1 лимфатический узел, 1 яичник, 7 поджелудочных желез, 1 периферический нерв, 1 мозговой придаток, 3

плевры, 1 предстательная железа, 6 прямых кишок, 3 скелетных мышцы, 1 серозная мембрана, 3 образца кожи, 4 селезенки, 7 желудков, 1 семенник, 2 вилочковые железы, 3 щитовидные железы, 2 матки, 2 вены и 20 печеней; Фигура 1B) ALDH1L1, пептид: KLQAGTVFV (A*02) (SEQ ID NO: 2), ткани слева направо; 1 жировая ткань, 3 надпочечные железы, 2 артерии, 2 костных мозга, 7 головных мозгов, 3 молочной железы, 13 толстых кишок, 4 пищевода, 2 желчных пузыря, 3 желудочно-кишечных тракта, 3 сердца, 16 почек, 4 образца лейкоцитов, 45 легких, 1 лимфатический узел, 1 яичник, 7 поджелудочных желез, 1 периферический нерв, 1 мозговой придаток, 3 плевры, 1 предстательная железа, 6 прямых кишок, 3 скелетных мышцы, 1 серозная мембрана, 3 образца кожи, 4 селезенки, 7 желудков, 1 семенник, 2 вилочковые железы, 3 щитовидные железы, 2 матки, 2 вены и 20 печеней; Фигура 1C) C8B, пептид: AYLLQPSQF (A*24) (SEQ ID NO: 200), ткани слева направо: включая образцы 2 надпочечных желез, 1 артерии, 4 головных мозга, 1 молочной железы, 5 толстых кишок, 1 сердца, 13 почек, 9 легких, 3 поджелудочных желез, 2 прямых кишок, 3 образца кожи, 1 селезенки, 12 желудков, 1 вилочковой железы, 2 маток и 9 печеней; Фигура 1D) RAD23B пептид: KIDEKNFVV (SEQ ID NO: 63) 1 серозная мембрана, 1 жировая ткань, 3 надпочечные железы, 2 артерии, 2 костных мозга, 7 головных мозгов, 3 молочной железы, 13 толстых кишок, 2 желчных пузыря, 3 желудочно-кишечных тракта, 3 сердца, 12 почек, 4 образца лейкоцитов, 19 печеней, 43 легких, 1 лимфатический узел, 1 яичник, 6 поджелудочных желез, 1 периферический нерв, 1 мозговой придаток, 3 плевры, 1 предстательная железа, 6 прямых кишок, 3 скелетных мышцы, 3 образца кожи, 4 селезенки, 5 желудков, 1 семенник, 2 вилочковые железы, 3 щитовидные железы, 2 матки, 2 вены, 4 пищевода; Фигура 1E) RAD23B пептид: KIDEKNFVV (SEQ ID NO: 63), показаны только образцы, на которых презентировался пептид: 5 клеточных линий, 1 нормальная ткань (1 надпочечная железа), 16 раковых тканей (2 раковых заболевания головного мозга, 4 раковых заболевания печени, 5 раковых заболеваний легких, 1 раковое заболевание прямой кишки, 1 раковое заболевание мочевого пузыря, 3 раковых заболевания матки) (слева направо); Фигура 1F) RFNG RLPPDTLLQQV (SEQ ID NO: 92), показаны только образцы, на которых презентировался пептид: 1 серозная мембрана, 1 жировая ткань, 3 надпочечные

железы, 2 артерии, 2 костных мозга, 7 головных мозгов, 3 молочной железы, 13 толстых кишок, 2 желчных пузыря, 3 желудочно-кишечных тракта, 3 сердца, 12 почек, 4 образца лейкоцитов, 19 печеней, 43 легких, 1 лимфатический узел, 1 яичник, 6 поджелудочных желез, 1 периферический нерв, 1 мозговой придаток, 3 плевры, 1 предстательная железа, 6 прямых кишок, 3 скелетных мышцы, 3 образца кожи, 4 селезенки, 5 желудков, 1 семенник, 2 вилочковые железы, 3 щитовидные железы, 2 матки, 2 вены, 4 пищевода; Фигура 1G) RFNG пептид: RLPPDTLLQQV (SEQ ID NO: 92), показаны только образцы, на которых презентировался пептид: 2 клеточные линии, 2 нормальные ткани (2 надпочечные железы), 17 раковых тканей (1 раковое заболевание головного мозга, 1 раковое заболевание молочной железы, 1 раковое заболевание пищевода, 5 раковых заболеваний печени, 4 раковых заболеваний легких, 1 раковое заболевание яичника, 1 раковое заболевание предстательной железы, 2 раковых заболевания мочевого пузыря, 1 раковое заболевание матки) (слева направо); Фигура 1H) FLVCR1 пептид: SVWFGPKEV (SEQ ID NO: 104) 1 серозная мембрана, 1 жировая ткань, 3 надпочечные железы, 2 артерии, 2 костных мозга, 7 головных мозгов, 3 молочной железы, 13 толстых кишок, 2 желчных пузыря, 3 желудочно-кишечных тракта, 3 сердца, 12 почек, 4 образца лейкоцитов, 19 печеней, 43 легких, 1 лимфатический узел, 1 яичник, 6 поджелудочных желез, 1 периферический нерв, 1 мозговой придаток, 3 плевры, 1 предстательная железа, 6 прямых кишок, 3 скелетных мышцы, 3 образца кожи, 4 селезенки, 5 желудков, 1 семенник, 2 вилочковые железы, 3 щитовидные железы, 2 матки, 2 вены, 4 пищевода; Фигура 1I) FLVCR1 пептид: SVWFGPKEV (SEQ ID NO: 104), показаны только образцы, на которых презентировался пептид: 9 клеточных линий, 1 нормальная ткань (1 тонкий кишечник), 16 раковых тканей (1 раковое заболевание головного мозга, 1 раковое заболевание молочной железы, 5 раковых заболеваний печени, 5 раковых заболеваний легких, 1 раковое заболевание кожи, 1 раковое заболевание желудка, 1 раковое заболевание мочевого пузыря, 1 раковое заболевание матки) (слева направо); Фигура 1J) IKBKAP пептид: LLFPHPVNQV (SEQ ID NO: 156) 1 серозная мембрана, 1 жировая ткань, 3 надпочечные железы, 2 артерии, 2 костных мозга, 7 головных мозгов, 3 молочной железы, 13 толстых кишок, 2 желчных пузыря, 3 желудочно-кишечных тракта, 3

сердца, 12 почек, 4 образца лейкоцитов, 19 печеней, 43 легких, 1 лимфатический узел, 1 яичник, 6 поджелудочных желез, 1 периферический нерв, 1 мозговой придаток, 3 плевры, 1 предстательная железа, 6 прямых кишок, 3 скелетных мышцы, 3 образца кожи, 4 селезенки, 5 желудков, 1 семенник, 2 вилочковые железы, 3 щитовидные железы, 2 матки, 2 вены, 4 пищевода; Фигура 1K) IKVKAP пептид: LLFPHPVNQV (SEQ ID NO: 156), показаны только образцы, на которых презентировался пептид: 7 клеточных линий, 2 первичные культуры, 1 нормальная ткань (1 толстая кишка), 34 раковых тканей (1 раковое заболевание костного мозга, 1 раковое заболевание молочной железы, 1 раковое заболевание толстой кишки, 2 раковых заболеваний пищевода, 2 раковых заболевания лейкоцитарного лейкоза, 4 раковых заболеваний печени, 11 раковых заболеваний легких, 3 раковых заболеваний лимфатических узлов, 5 раковых заболеваний яичника, 4 раковых заболеваний мочевого пузыря) (слева направо); Фигура 1L) NKD1 пептид: FLDTPIAKV (SEQ ID NO: 47), 1 серозная мембрана, 1 жировая ткань, 3 надпочечные железы, 2 артерии, 2 костных мозга, 7 головных мозгов, 3 молочной железы, 13 толстых кишок, 2 желчных пузыря, 3 желудочно-кишечных тракта, 3 сердца, 12 почек, 4 образца лейкоцитов, 19 печеней, 43 легких, 1 лимфатический узел, 1 яичник, 6 поджелудочных желез, 1 периферический нерв, 1 мозговой придаток, 3 плевры, 1 предстательная железа, 6 прямых кишок, 3 скелетных мышцы, 3 образца кожи, 4 селезенки, 5 желудков, 1 семенник, 2 вилочковые железы, 3 щитовидные железы, 2 матки, 2 вены, 4 пищевода; Фигура 1M) NKD1 пептид: FLDTPIAKV (SEQ ID NO: 47), показаны только образцы, на которых презентировался пептид: 1 другое заболевание (черепно-мозговая грыжа), 2 нормальные ткани (1 легкое и 1 селезенка), 35 раковых тканей (5 раковых заболеваний головного мозга, 6 раковых заболеваний толстой кишки, 1 раковое заболевание пищевода, 6 раковых заболеваний печени, 9 раковых заболеваний легких, 1 раковое заболевание яичника, 1 раковое заболевание предстательной железы, 4 раковых заболевания прямой кишки, 2 раковых заболевания желудка) (слева направо);

На Фигуре 2 представлены примеры профилей экспрессии (относительная экспрессия в сравнении с нормальной почкой) исходных генов настоящего

изобретения, которые в высокой степени экспрессированы в избытке или эксклюзивно экспрессированы в клетках ГКК, для панели нормальных тканей (темно-серый цвет) и 12 образцов ГКК (серый). Фигура 2A) APOB, ткани слева направо: 1 надпочечная железа, 1 артерия, 1 костный мозг, 1 головной мозг (целиком), 1 молочная железа, 1 толстая кишка, 1 пищевод, 1 сердце, 3 почки, 1 образец лейкоцитов, 1 печень, 1 легкое, 1 лимфатический узел, 1 яичник, 1 поджелудочная железа, 1 плацента, 1 предстательная железа, 1 слюнная железа, 1 скелетная мышца, 1 кожа, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 семенник, 1 вилочковая железа, 1 щитовидная железа, 1 мочевого пузырь, 1 шейка матки, 1 матки, 1 вена; Фигура 2B) AMACR, ткани слева направо: 1 надпочечная железа, 1 артерия, 1 костный мозг, 1 головной мозг (целиком), 1 молочная железа, 1 толстая кишка, 1 пищевод, 1 сердце, 3 почки, 1 образец лейкоцитов, 1 печень, 1 легкое, 1 лимфатический узел, 1 яичник, 1 поджелудочная железа, 1 плацента, 1 предстательная железа, 1 слюнная железа, 1 скелетная мышца, 1 кожа, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 семенник, 1 вилочковая железа, 1 щитовидная железа, 1 мочевого пузырь, 1 шейка матки, 1 матки, 1 вена; Фигура 2C) ALDH1L1, ткани слева направо: 1 надпочечная железа, 1 артерия, 1 костный мозг, 1 головной мозг (целиком), 1 молочная железа, 1 толстая кишка, 1 пищевод, 1 сердце, 3 почки, 1 образец лейкоцитов, 1 печень, 1 легкое, 1 лимфатический узел, 1 яичник, 1 поджелудочная железа, 1 плацента, 1 предстательная железа, 1 слюнная железа, 1 скелетная мышца, 1 кожа, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 семенник, 1 вилочковая железа, 1 щитовидная железа, 1 мочевого пузырь, 1 шейка матки, 1 матки, 1 вена; Фигура 2D) FGG, ткани слева направо: 1 надпочечная железа, 1 артерия, 1 костный мозг, 1 головной мозг (целиком), 1 молочная железа, 1 толстая кишка, 1 пищевод, 1 сердце, 3 почки, 1 образец лейкоцитов, 1 печень, 1 легкое, 1 лимфатический узел, 1 яичник, 1 поджелудочная железа, 1 плацента, 1 предстательная железа, 1 слюнная железа, 1 скелетная мышца, 1 кожа, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 семенник, 1 вилочковая железа, 1 щитовидная железа, 1 мочевого пузырь, 1 шейка матки, 1 матки, 1 вена; Фигура 2E) C8B, ткани слева направо: 1 надпочечная железа, 1 артерия, 1 костный мозг, 1 головной мозг (целиком), 1 молочная железа, 1 толстая кишка, 1 пищевод, 1 сердце, 3 почки, 1

образец лейкоцитов, 1 печень, 1 легкое, 1 лимфатический узел, 1 яичник, 1 поджелудочная железа, 1 плацента, 1 предстательная железа, 1 слюнная железа, 1 скелетная мышца, 1 кожа, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 семенник, 1 вилочковая железа, 1 щитовидная железа, 1 мочевого пузырь, 1 шейка матки, 1 матки, 1 вена;и Фигура 2F) HSD17B6, ткани слева направо: в том числе 1 надпочечная железа, 1 артерия, 1 костный мозг, 1 головной мозг (целиком), 1 молочная железа, 1 толстая кишка, 1 пищевод, 1 сердце, 3 почки, 1 образец лейкоцитов, 1 печень, 1 легкое, 1 лимфатический узел, 1 яичник, 1 поджелудочная железа, 1 плацента, 1 предстательная железа, 1 слюнная железа, 1 скелетная мышца, 1 кожа, 1 тонкая кишка, 1 селезенка, 1 желудок, 1 семенник, 1 вилочковая железа, 1 щитовидная железа, 1 мочевого пузырь, 1 шейка матки, 1 матки, 1 вена.

На Фигуре 3 показаны типичные результаты проточного цитометрического анализа после пептид-специфического окрашивания мультимеров. Дальнейшие объяснения приводятся в примере 4.

На Фигуре 4 показаны типичные результаты проточного цитометрического анализа после пептид-специфического окрашивания мультимеров. Дальнейшие объяснения приводятся в примере 4.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1: Идентификация и количественное определение опухолеассоциированных пептидов, презентруемых на поверхности клетки

Образцы тканей

Опухолевые ткани пациентов были получены из Университетской клиники общей, висцеральной и трансплантационной хирургии г. Тюбинген, Германия; Национального онкологического института «Pascale». Отделение молекулярной биологии и вирусной онкологии, Via Mariano, Неаполь, Италия; компании Bio-Options Inc., Бриа, Калифорния, США; компании ProteoGenex Inc., Кальвер-Сити, Калифорния, США; компании Asterand Europe, Royston Herts, Великобритания.

Перед проведением хирургического вмешательства было получено информированное согласие всех пациентов в письменной форме. Сразу же после операции 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, K., 1991; Seeger, F.H.T. 1999) при использовании HLA-A*02-специфического антитела BB7.2 или HLA-A, -B, -C-специфического антитела W6/32, CNBr-активированной сефарозы, кислотной обработки и ультрафильтрации.

Масс-спектрометрический анализ

Полученные пулы комплексов пептид-HLA были разделены в соответствии с их гидрофобностью обратнофазовой хроматографией (nanoAcquity UPLC system, Waters), и элюированные пептиды анализировали на гибридных масс-спектрометрах LTQ-velos и -fusion (ThermoElectron), снабженном источником ESI. Пулы пептидов наносили непосредственно на аналитическую микрокапиллярную колонку из плавленого кварца (75 мкм в/д x 250 мм) с обращеннофазовым сорбентом 1,7 мкм C18 (Waters) с применением скорости потока в 400 нл в минуту. Затем пептиды разделяли с использованием двухэтапного 180-минутного бинарного градиента от 10% до 33% растворителя В при скорости потока 300 нл в минуту. Для создания градиента использовали растворитель А (0,1% муравьиной кислоты в воде) и растворитель В (0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле). Позолоченный стеклянный капилляр (PicoTip, New Objective) использовали для введения в источник наноESI. Масс-спектрометры LTQ-Orbitrap работали в информационно-зависимом режиме с применением стратегии TOP5. Вкратце, цикл сканирования начинался с полного сканирования с высокой точностью масс на спектрометре Orbitrap ($R = 30\ 000$), за чем следовало сканирование MS/MS также на Orbitrap ($R = 7500$) на 5 особенно многочисленных ионах-предшественниках с

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

Относительный количественный анализ методом ЖХ/МС без изотопных меток проводили путем подсчета ионов, т. е. с помощью экстракции и анализа характеристик ЖХ/МС (Mueller et al. 2007a). 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. 2007b; Sturm et al. 2008). Наконец, все результаты спектров ЖХ/МС были сопоставлены методом перекрестных ссылок с результатами по идентификации последовательности, чтобы объединить количественные данные различных образцов и тканей в профили презентации пептидов. Количественные данные были нормализованы с применением двухуровневой системы в соответствии с центральной тенденцией с целью учета вариабельности внутри технических и биологических повторных измерений. Таким образом, каждый идентифицированный пептид может быть ассоциирован с количественными данными, позволяющими провести относительную количественную оценку образцов и тканей. Кроме того, все количественные данные, полученные для пептидов-кандидатов, были проконтролированы вручную в целях обеспечения взаимосогласованности данных и для проверки точности автоматического метода анализа. Для каждого пептида был рассчитан профиль презентации, показывающий средний уровень презентации в образце, а также вариабельность репликатов. В профиле сравниваются образцы ГКК 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 (+). S* = фосфосерин

SEQ ID No.	Последовательность	Презентация пептида
1	VMAPFTMTI	+++
2	KLQAGTVFV	+++
4	KLQDFSDQL	+++
5	ALVEQGFTV	+++
6	KLSPTVVGL	+++
7	ALVDTLKfV	+++
8	KLLEEATISV	+
9	ALANQKLYSV	+
10	SLLEEFDFHV	+++
11	SLSQELVGV	+
12	FLAELAYDL	+++
14	ALADLTGTVV	+++
15	LLYGHTVTV	+
16	SLLGGNIRL	++
17	RVAS*PTSGV	+
19	FLEETKATV	+++
20	KLSNVLQQV	+++
21	QLIEVSSPITL	+++
22	RIAGIRGIQGV	+++
23	RLYDPASGTISL	+
24	SLAEEKLQASV	+++
25	SLDGKAAATEL	+++
26	SLLHTIYEV	+++
27	TLPDFRLPEI	+++
28	TLQDHLNSL	+++
29	YIQDEINTI	+++
30	YLGEGPRMV	++

31	YQMDIQQEL	++
32	ALNAVRLLV	+++
33	LLHGHIVEL	+
34	SLAEGTATV	+++
38	ALADVWHEA	+
39	ALDPKANFST	+++
40	ALLAEGITWV	+
42	ALLGGNVRMML	+++
44	ALQDAIRQL	+
47	FLDTPIAKV	+
49	FLYPEKDEPT	+++
51	GLAEELVRA	+
52	GLFNAELLEA	+
53	GLIHLEGDTV	+++
54	GLLDPNVKSIFV	+++
55	GLYGRTIEL	+
56	GVLPGLVGV	+
57	HLTEAIQYV	++
58	ILADLNLSV	+
59	ILADTFIGV	++
60	ILSPLSVAL	+
61	KIADFELPTI	+++
62	KIAGTNAEV	++
66	KLHEEIDRV	++
67	CLKKETIQKL	+++
70	KLLDLETERILL	++
71	KLLDNWDSV	+++
72	KLSEAVTSV	+
75	KQMEPLHAV	+
76	LLADIGGDPFAA	+++
77	LLHEENFSV	+
79	LLLSTGYEA	+++
81	NLASFIEQVAV	++
82	NVFDGLVRV	+
83	QLHDFVMSL	+++
84	QLTPVLVSV	++
85	RILPKVLEV	+
86	RLAAFYSQV	+++
88	RLIDRIKTV	+++
89	RLIEEIKNV	+++
91	RLPDIPLRQV	+

93	RLYTMDGITV	+++
94	RMSDVVKGV	+++
96	SLLEPNVIRV	++
97	SLLPQLIEV	++
98	SLLSPEHLQYL	++
99	SLSAFLPSL	+++
101	SLWEGGVRGV	+++
103	SMGDHLWVA	+++
107	TLGQFYQEV	+++
108	TLLKKISEA	+++
109	TLYALSHAV	+
111	TVMDIDTSGTFNV	+
113	VLMDKLEVEL	++
114	VLSQVYSKV	+++
116	WWIPAISAV	+++
117	YAFPKSITV	+++
119	YLDKNLTVSV	+
120	YLGEEYVKA	+++
121	YLITGNLEKL	+
122	YLSQAADGAKVL	+++
123	YLWDLDHGFAGV	++
124	LLIDVVTYL	+++
126	TLLDSPIKV	++
127	VLIGSNHSL	+
128	GLAFSLNGV	+
129	SQADVIPAV	+
130	ALDAGAVYTL	++
131	ALDSGAFQSV	++
132	ALHEEVGV	+
133	ALLEMDARL	+
134	ALLETNPYLL	++
135	ALLGKIEKV	+
137	ALPTVLVGV	++
139	ALSSKPAEV	+
142	AVIGGLIYV	++
144	FIQLITGV	+
146	FLWTEQAHTV	+
147	GLAPGGLAVV	+
148	GLFAPLVFL	+++
151	HLAKVTAEV	+
154	KLTDHLKYV	+

161	RLLDEQFAV	+
162	RLMSALTQV	++
163	RLTESVLYL	++
164	RMLIKLLEV	+
167	SLAESSFDV	++
168	SLAVLVPIV	+
169	SLFEWFHPL	+
170	SLHNGVIQL	+
171	SLIPAVLTV	+
172	SLLNFLQHL	+
173	SLTSEIHFL	+
174	TLAELGAVQV	+
176	TLGQIWDV	+
177	VLDEPYEKV	+
179	YIHNILYEV	++
180	YLGPHIASVTL	++
181	YLLEKFVAV	+
184	VVLDGGQIVTV	+
185	ALFPALRPGGFQA	++
186	VLLAQIIQV	+
187	SYPTFFPRF	+
188	RYSAGWDAKF	+
189	AFSPDSHYLLF	+++
190	RYNEKCFKL	+++
191	KYPDIISRI	++
192	SYITKPEKW	+
193	IYPGAFVDL	+++
194	QYASRFVQL	+++
195	RYAPPPSFSEF	+++
196	AYLKWISQI	+++
197	RWPKKSAEF	+
198	LYWSHPRKF	+
200	AYLLQPSQF	+++
201	AYVNTFHNI	+++
202	AYGTYRSNF	+++
203	YYGILQEKI	+++
204	KYRLTYAYF	++
205	VYGLQRNLL	+
206	KWPETPLLL	+++
208	SYNPAENAVLL	++
210	AYPAIRYLL	++

211	IYIPSYFDF	++
212	VYGDVISNI	+++
213	YYNKVSTVF	+
214	IYVTSIEQI	+++
217	DYIPYVFKL	+++
218	VYQGAIHQI	+
219	GVMAGDIYSV	+
220	SLLEKELESV	++
221	ALCEENMRGV	+
224	ALASVIKEL	+
225	KMDPVAYRV	+
226	AVLGPLGLQEV	+
227	ALLKVNQEL	+
228	YLITSVELL	++
229	KMFESFIESV	++
230	VLTEFTREV	+
231	RLFNDPVAMV	++
233	ALLGKLDAL	+
234	YLEPYLKEV	+
236	ALADKELLPSV	++
237	ALRGEIETV	+++
238	AMPPPPQGV	++
239	FLLGFIPAKA	+
240	FLWERPTLLV	+++
241	FVLPLLGLHEA	++
242	GLFAPVHKV	+
243	GLLDNPELRV	+++
244	KIAELLENV	+
245	KLGA VFNQV	+
248	KLNDLIQRL	+
249	LLLGERVAL	+++
250	NLAEVVERV	++
251	RLFADILNDV	++
252	RTIEYLEEV	+
253	RVPPPPQSV	+
255	SLFGQDVKAV	+++
256	SLFQGVEFHVV	+
257	SLLEKAGPEL	+++
258	SLMGPVVHEV	+
260	TLMDMRLSQV	++
261	VLFQEALWHV	++

263	VLYPSLKEI	+
264	VMQDPEFLQSV	++
265	WLIEDGKVVTV	++
266	SLLESNKDLLL	+
267	ALNENINQV	+
268	KLYQEVEIASV	+
269	YLMEGSYNKV	+
270	SVLDQKILL	++
271	LLLDKLILL	+
272	QQLDSKFLEQV	+
273	AILETAPKEV	++
274	ALAEALKEV	+
275	ALIEGAGILL	++
276	ALLEADVNIKL	+
277	ALLEENSTPQL	+
278	ALTSVVVTL	+
279	ALWTGMHTI	+
281	GLLAGDRLVEV	+
282	GQFPSYLETV	++
283	ILSGIGVSQV	+
284	KLDAFVEGV	+
286	KVLDKVFRA	+
288	LLDDSLVSI	+
289	LLLEEGGLVQV	++
290	NLIDLDDLYV	++
292	RIPAYFVTV	+
293	FLASESLIKQI	++
295	SLFSSPPEI	++
297	TLFYSLREV	+
298	TMAKESSIIGV	++
299	ALLRVTPFI	+
301	VLADFGARV	+++
302	KIQEILTQV	+++
303	GVYDGEEHSV	+
304	SLIDQFFGV	+++
305	GVLENIFGV	+
308	ALLRTVVSV	+
309	GLIEIISNA	+
310	SLWGGDVVL	+
311	FLIPIYHQV	+
312	RLGIKPESV	+++

313	LTAPPEALLMV	+
314	YLAPFLRNV	+
315	KVLDGSPIEV	+
316	LLREKVEFL	+
317	KLPEKWESV	++
318	KLNEINEKI	+
319	KLFNEFIQL	+
320	GLADNTVIAKV	+
322	ILYDIPDIRL	+
324	RLFETKITQV	++
326	ALSDGVHKI	++
327	GLNEEIARV	++
328	RLEEDDGDVAM	+
329	SLIEDLILL	+++
330	SMSADVPLV	++
332	AMLAVLHTV	+
334	SILTIEDGIFEV	+
335	SLLPVDIRQYL	++
336	YLPTFFLTV	+
337	TLLAAEFLKQV	+
338	KLFDSDPITVTV	+++
340	KVFDEVIEV	+
342	AMSSKFFLV	+
343	LLLPDYLV	+
345	SYNPLWLRI (A*24)	+++
346	LYQILQGIVF (A*24)	+++
347	ALNPADITV	+

ПРИМЕР 2:

Профили экспрессии генов, кодирующих пептиды по изобретению

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

получен из белка, являющегося уникальным для опухоли и не встречающегося на нормальных тканях.

Источники и приготовление РНК

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

Суммарная РНК здоровых человеческих тканей была куплена (Ambion, Хантингтон, Великобритания; Clontech, Гейдельберг, Германия; Stratagene, Амстердам, Нидерланды; BioChain, Хейард, Калифорния, США). РНК нескольких индивидов (от 2 до 123 индивидов) была смешана таким образом, что РНК каждого индивида имела равный вес.

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

Эксперименты с микрочипами

Анализ экспрессии генов всех образцов РНК из опухолевой и нормальной ткани был произведен с помощью олигонуклеотидных микрочипов Affymetrix Human Genome (HG) U133A или HG-U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Санта Клара, Калифорния, США). Все этапы были выполнены в соответствии с руководством Affymetrix. Вкратце, двухнитевую кДНК синтезировали из 5–8 мкг суммарной РНК с использованием SuperScript RTII (Invitrogen) и олиго-dT-T7 праймера (MWG Biotech, Эберсберг,

Германия), как описывается в руководстве. Транскрипцию *in vitro* производили с использованием набора для мечения РНК-транскриптов BioArray High Yield RNA Transcript Labelling Kit (ENZO Diagnostics, Inc., Фармингейл, Нью-Йорк, США) для чипов U133A или набора GeneChip IVT Labelling Kit (Affymetrix) для чипов U133 Plus 2.0 с последующей фрагментацией, гибридизацией кРНК и окрашиванием стрептавидин-фикоэритрином и биотинилированным антистрептавидиновым антителом (Molecular Probes, Лейден, Нидерланды). Изображения сканировали на Agilent 2500A GeneArray Scanner (U133A) или Affymetrix Gene-Chip Scanner 3000 (U133 Plus 2.0), а данные анализировали в программе GCOS (Affymetrix) с использованием настроек по умолчанию для всех параметров. Для нормализации использовались 100 служебных генов, предоставленных Affymetrix. Относительные значения экспрессии были подсчитаны из отношений логарифмов зарегистрированных сигналов, полученных компьютерной программой, а значение для образца нормальной почки было произвольно задано значением 1,0. Типичные профили экспрессии исходных генов, предложенных в настоящем изобретении, которые в высокой степени экспрессированы в избытке или эксклюзивно экспрессированы в клетках ГКК, представлены на Фигуре 2. Показатели экспрессии других отдельных генов показаны в Таблице 9.

Таблица 9: Показатели экспрессии. В таблице представлены пептиды генов, которые в очень высокой степени избыточно экспрессируются в опухолях в сравнении с панелью нормальных тканей (+++), в высокой степени избыточно экспрессируются в опухолях в сравнении с панелью нормальных тканей (++) или избыточно экспрессируются в опухолях в сравнении с панелью нормальных тканей (+).

SEQ ID No	Последовательность	Экспрессия гена
1	VMAPFTMTI	+++
2	KLQAGTVFV	++
3	ILDDNMQKL	+
4	KLQDFSDQL	+++
5	ALVEQGFTV	+++

7	ALVDTLKFV	+++
10	SLLEEFDFHV	+
13	GLIDTETAMKAV	+++
19	FLEETKATV	+++
20	KLSNVLQQV	+++
21	QLIEVSSPITL	+++
25	SLDGKAALTEL	+++
27	TLPDFRLPEI	+++
28	TLQDHLNSL	+++
29	YIQDEINTI	+++
31	YQMDIQQEL	+++
38	ALADVVEHA	+
39	ALDPKANFST	+
41	ALLELDEPLVL	+++
42	ALLGGNVRMML	+
44	ALQDAIRQL	+
45	ALQDQLVLV	++
46	AMAEMKVVL	++
48	FLLEQPEIQV	+
49	FLYPEKDEPT	+++
50	FTIPKLYQL	+++
52	GLFNAELLEA	+++
53	GLIHLEGDTV	+++
55	GLYGRTIEL	+++
60	ILSPLSVAL	+
61	KIADFELPTI	+++
62	KIAGTNAEV	+
66	KLHEEIDRV	+++
67	KLKETIQKL	+++
68	KLLAATVLLL	+++
73	KLTLVIISV	+++
74	KLYDLELIV	+++
76	LLADIGGDPFAA	+
81	NLASFIEQVAV	+
82	NVFDGLVRV	+++
83	QLHDFVMSL	+++
84	QLTPVLVSV	++
85	RILPKVLEV	++
87	RLFEEENDVNL	+++
90	RLLDVLAPLV	+
93	RLYTMDGITV	+++

94	RMSDVVKGV	+
95	SICNGVPMV	++
97	SLLPQLIEV	+++
100	SLVGDIGNVNM	+++
103	SMGDHLWVA	+
105	SVYDGKLLI	+
106	TLAAIIHGA	++
107	TLGQFYQEV	+++
109	TLYALSHAV	+++
110	TVGGSEILFEV	+++
113	VLMDKLEVEL	+++
114	VLSQVYSKV	+++
116	WWIPAISAV	++
117	YAFPKSITV	+
119	YLDKNLTVSV	++
120	YLGEYVKA	+++
124	LLIDVVTYL	+++
126	TLLDSPIKV	+++
129	SQADVIPA	++
130	ALDAGAVYTL	++
132	ALHEEVVGV	++
141	AMGEKSFSV	+
142	AVIGGLIYV	+++
145	FLIAEYFEHV	++
146	FLWTEQAHTV	++
148	GLFAPLVFL	+
149	GLLSGLDIMEV	+++
154	KLTDHLKYV	+++
157	QLLPNLRAV	+
158	RIISGLVKV	++
160	RLLAKIICL	+++
163	RLTESVLYL	++
165	RVIEHVEQV	++
168	SLAVLVPIV	+++
172	SLLNFLQHL	+
173	SLTSEIHFL	+
175	TLFEHLPHI	++
177	VLDEPYEKV	++
182	YLLHFPMAL	+++
183	YLYNNEEQVGL	+++
187	SYPTFFPRF	+

188	RYSAGWDAKF	+++
192	SYITKPEKW	+
193	IYPGAFVDL	+
200	AYLLQPSQF	+++
204	KYRLTYAYF	+++
206	KWPETPLLL	+
215	IYTGNISSF	+++
217	DYIPYVFKL	+++
218	VYQGAIRQI	+++
228	YLITSVELL	+
233	ALLGKLDAI	+
249	LLLGERVAL	+
255	SLFGQDVKAV	+
259	TLITDGMRSV	+
263	VLYPSLKEI	+
273	AILETAPKEV	+
275	ALIEGAGILL	+
286	KVLDKVFRA	+
296	SLLSGRISTL	+
298	TMAKESSIIGV	+
301	VLADFGARV	++
302	KIQEILTQV	+
315	KVLDGSPIEV	++
318	KLNEINEKI	+++
320	GLADNTVIAKV	+
324	RLFETKITQV	++
327	GLNEEIARV	+
336	YLPTFFLTV	+
341	YLAIGIHEL	++
345	SYNPLWLRI (A*24)	++

ПРИМЕР 3: Реакция обмена лигандами под воздействием УФ-излучения/связывание пептида с HLA-A*02 и HLA-A*24

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 B, Toebe M, Hadrup SR, van Esch WJ, Molenaar AM, Schumacher TN, Ovaas H. Generation of peptide-MHC class I complexes through UV-mediated ligand exchange. Nat Protoc. 2006;1(3):1120-32.).

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*0201/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 10А. Показатели связывания с молекулами МНС I класса

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

Seq ID	Код пептида	Пептидный обмен
12	GPC3-001	++++
5	APOB-001	++++
7	APOB-002	++++
1	APOB-003	++++
13	HSD11B1-001	++++
227	SAMM-001	++++
4	APOB-004	++++
232	МАРКАРК5-001	++++
10	USO-001	++++
304	USP14-001	++++
219	ADF-012	++++
223	IDI1-001	++++
224	IFT81-001	++++
14	NCST-001	++++
228	ACSL4-001	++++
230	IPO9-001	++++
15	SLC35B2-001	++++
16	ACSL3-001	++++
303	MAGEB2-001	+++
226	THT-001	+++
8	DYM-001	+++
6	AXIN2-001	+++
225	QAR-001	+++
2	ALDH1L1-001	+++
221	EEF2-001	+++
220	DRG2-001	+++
301	C1QTNF3-001	+++
11	ZNF318-001	+++

Таблица 10Б: Показатели связывания с молекулами МНС I класса

Связывание рестриктированных по молекулам HLA I класса пептидов с HLA-A*02 или HLA-A*24 в зависимости от пептидной последовательности классифицировали по выходу пептидного обмена: $\geq 10\%$ = +; $\geq 20\%$ = ++; $\geq 50\%$ = +++; $\geq 75\%$ = +++++. S* = фосфосерин.

SEQ ID No	Последовательность	Пептидный обмен
1	VMAPFTMTI	"++++"
2	KLQAGTVFV	"++++"

SEQ ID No	Последовательность	Пептидный обмен
3	ILDDNMQKL	"++++"
4	KLQDFSDQL	"++++"
5	ALVEQGFTV	"++++"
6	KLSPTVVGL	"++++"
7	ALVDTLKFV	"++++"
8	KLLEEATISV	"++++"
9	ALANQKLYSV	"++++"
10	SLLEEFDFHV	"++++"
11	SLSQELVGV	"++++"
12	FLAELAYDL	"++++"
13	GLIDTETAMKAV	"++++"
14	ALADLTGTVV	"++++"
15	LLYGHTVTV	"++++"
16	SLLGGNIRL	"++++"
17	RVAS*PTSGV	"++++"
18	ALYGKTEVV	"++++"
19	FLEETKATV	"++++"
20	KLSNVLQQV	"++++"
21	QLIEVSSPITL	"++++"
22	RIAGIRGIQGV	"++++"
23	RLYDPASGTISL	"++++"
24	SLAEEKLQASV	"++++"
25	SLDGKAALTEL	"++++"
26	SLLHTIYEV	"++++"
27	TLPDFRLPEI	"++++"
28	TLQDHLNSL	"++++"
29	YIQDEINTI	"++++"
30	YLGEGPRMV	"++++"
31	YQMDIQQEL	"++++"
32	ALNAVRLLV	"++++"
33	LLHGHIVEL	"++++"
34	SLAEGTATV	"++++"
35	SLQESILAQV	"++++"
36	ILNVDGLIGV	"++++"
37	LLLPLLPLSP	"++++"
38	ALADVVEHA	"++++"
39	ALDPKANFST	"++++"
40	ALLAEGITWV	"++++"
41	ALLELDEPLVL	"++++"

SEQ ID No	Последовательность	Пептидный обмен
42	ALLGGNVRMML	"++++"
43	ALLGVWTSV	"++"
44	ALQDAIRQL	"++++"
45	ALQDQLVLV	"++++"
46	AMAEMKVVL	"++++"
47	FLDTPIAKV	"++"
48	FLLEQPEIQV	"++++"
49	FLYPEKDEPT	"++"
50	FTIPKLYQL	"++"
51	GLAEELVRA	"++"
52	GLFNAELLEA	"++++"
53	GLIHLEGDTV	"++++"
54	GLLDPNVKSIFV	"++++"
55	GLYGRTIEL	"++++"
56	GVLPGLVGV	"++++"
57	HLTEAIQYV	"++++"
58	ILADLNLSV	"++++"
59	ILADTFIGV	"++++"
60	ILSPLSVAL	"++++"
61	KIADFELPTI	"++++"
62	KIAGTNAEV	"++"
63	KIDEKNFVV	"++++"
64	KILEETLYV	"++++"
65	KLFSGDELLEV	"++++"
66	KLHEEIDRV	"++++"
67	KLKETIQKL	"++++"
68	KLLAATVLLL	"++"
69	KLLDEVTYLEA	"++++"
70	KLLDLETERILL	"++++"
71	KLLDNWDSV	"++++"
72	KLSEAVTSV	"++++"
74	KLYDLELIV	"++++"
75	KQMEPLHAV	"++"
76	LLADIGGDPFAA	"++++"
77	LLHEENFSV	"++++"
78	LLIDDEYKV	"++++"
80	LLYEGKLTLL	"++++"
81	NLASFIEQVAV	"++++"
82	NVFDGLVRV	"++++"

SEQ ID No	Последовательность	Пептидный обмен
83	QLHDFVMSL	"++++"
84	QLTPVLVSV	"+++"
85	RILPKVLEV	"+++"
86	RLAAFYSQV	"+++"
87	RLFEENDVNL	"+++"
88	RLIDRIKTV	"++"
89	RLIEEIKNV	"++"
90	RLLDVLAPLV	"+++"
91	RLPDIPLRQV	"+++"
92	RLPPDTLLQQV	"+++"
93	RLYTMDGITV	"++"
94	RMSDVVKGV	"+++"
95	SICNGVPMV	"+++"
96	SLLEEPNVIRV	"++++"
97	SLLPQLIEV	"++++"
98	SLLSPEHLQYL	"+++"
99	SLSAFLPSL	"++++"
100	SLVGDIGNVNM	"++"
101	SLWEGGVRGV	"+++"
102	SLWSVARGV	"+++"
103	SMGDHLWVA	"+++"
104	SVWFGPKEV	"+++"
105	SVYDGKLLI	"++++"
106	TLAAIIHGA	"+++"
107	TLGQFYQEV	"++++"
108	TLLKKISEA	"+++"
109	TLYALSHAV	"+++"
110	TVGGSEILFEV	"++++"
111	TVMDIDTSGTFNV	"+++"
112	VLGEVKVGV	"++++"
113	VLMDKLVLEL	"++++"
114	VLSQVYSKV	"+++"
115	VVLDDKDYFL	"+++"
116	WVIPAISAV	"++++"
117	YAFPKSITV	"+++"
118	YLDDEKNWGL	"+++"
119	YLDKNLTVSV	"+++"
120	YLGEEYVKA	"++"
121	YLITGNLEKL	"+++"

SEQ ID No	Последовательность	Пептидный обмен
122	YLSQAADGAKVL	"++"
123	YLWDLDHGFAGV	"+++"
124	LLIDVVTYL	"++++"
125	ALYGRLEV	"++++"
126	TLLDSPIKV	"+++"
127	VLIGSNHSL	"++++"
128	GLAFSLNGV	"++++"
129	SQADVIPA	"+++"
130	ALDAGAVYTL	"++++"
131	ALDSGAFQSV	"+++"
132	ALHEEVGV	"+++"
133	ALLEMDARL	"+++"
134	ALLETNPYLL	"++++"
135	ALLGKIEKV	"+++"
136	ALLNQHYQV	"+++"
137	ALPTVLVGV	"++++"
138	ALSQVTL	"++++"
139	ALSSKPAEV	"+++"
140	ALTSISAGV	"++++"
141	AMGEKSFSV	"++++"
142	AVIGGLIYV	"++++"
145	FLIAEYFEHV	"++"
146	FLWTEQAHTV	"++"
147	GLAPGGLAVV	"+++"
148	GLFAPLVFL	"++++"
149	GLLSGLDIMEV	"++++"
150	GLSNLGIKSI	"++++"
151	HLAKVTAEV	"+++"
152	KLDNNLDSV	"+++"
154	KLTDHLKYV	"+++"
156	LLFHPVNQV	"++++"
157	QLLPNLRAV	"+++"
158	RIISGLVKV	"++"
159	RLFPDGIVTV	"+++"
160	RLLAKIICL	"++"
161	RLLDEQFAV	"+++"
162	RLMSALTQV-	"++"
163	RLTESVLYL	"+++"
164	RMLIKLLEV	"+++"

SEQ ID No	Последовательность	Пептидный обмен
165	RVIEHVEQV	"++++"
166	SILDIVTKV	"+++"
167	SLAESSFDV	"+++"
168	SLAVLVPIV	"+++"
169	SLFEWFHPL	"+++"
170	SLHNGVIQL	"+++"
171	SLIPAVLTV	"+++"
172	SLLNFLQHL	"+++"
173	SLTSEIHFL	"+++"
174	TLAELGAVQV	"+++"
175	TLFEHLPHI	"+++"
176	TLGQIWDV	"++++"
177	VLDEPYEKV	"+++"
178	YIFTTPKSV	"+++"
179	YIHNILYEV	"++++"
180	YLGPHIASVTL	"+++"
181	YLLEKFVAV	"+++"
182	YLLHFPMAL	"+++"
183	YLYNNEEQVGL	"++"
184	VVLDGGQIVTV	"+++"
185	ALFPALRPGGFQA	"+++"
186	VLLAQIIQV	"+++"
187	SYPTFFPRF	"++++"
188	RYSAGWDAKF	"++++"
189	AFSPDSHYLLF	"+++"
190	RYNEKCFKL	"++++"
191	KYPDIIISRI	"++++"
192	SYITKPEKW	"++++"
193	IYPGAFVDL	"++++"
195	RYAPPPSFSEF	"++++"
196	AYLKWISQI	"++++"
197	RWPKKSAEF	"++++"
198	LYWSHPRKF	"++++"
199	KFVTVQATF	"++++"
200	AYLLQPSQF	"++++"
201	AYVNTFHNI	"++++"
202	AYGTYRSNF	"++++"
203	YYGILQEKI	"++++"
205	VYGLQRNLL	"++++"

SEQ ID No	Последовательность	Пептидный обмен
206	KWPETPLLL	"++++"
207	IYLERFPIF	"++++"
208	SYNPAENAVLL	"++++"
209	VFHPRQELI	"+++"
210	AYPAIRYLL	"++++"
211	IYIPSYFDF	"++++"
212	VYGDVISNI	"++++"
213	YYNKVSTVF	"++++"
214	IYVTSIEQI	"++++"
215	IYTGNISSF	"++++"
216	IYADVGEEF	"++++"
217	DYIPYVFKL	"++++"
218	VYQGAI RQI	"++++"
219	GVMAGDIYSV	"++++"
220	SLLEKELESV	"+++"
221	ALCEENMRGV	"+++"
222	LTDITKGV	"++"
223	FLFNTENKLLL	"++++"
224	ALASVIKEL	"+++"
225	KMDPVA YRV	"+++"
226	AVLGPLGLQEV	"+++"
227	ALLKVNQEL	"++++"
228	YLITSVELL	"++++"
229	KMFESFIESV	"+++"
230	VLTEFTREV	"++++"
231	RLFNDPVAMV	"++++"
232	KLAEIVKQV	"++++"
233	ALLGKLD AI	"++++"
234	YLEPYLKEV	"++++"
235	KLFE EIREI	"++++"
236	ALADKELLPSV	"+++"
237	ALRGEIETV	"+++"
238	AMP P P P P QGV	"++"
239	FLLGFIPAKA	"+++"
240	FLWERPTLLV	"+++"
241	FVLPLLGLHEA	"++"
242	GLFAPVHKV	"+++"
243	GLLDNPELRV	"+++"
244	KIAELLE NV	"++++"
245	KLGA VFNQV	"++++"

SEQ ID No	Последовательность	Пептидный обмен
246	KLISSYYNV	"++++"
247	KLLDTMVDTFL	"++++"
248	KLNDLIQRL	"++++"
249	LLLGERVAL	"++++"
250	NLAEVVERV	"++++"
251	RLFADILNDV	"++++"
252	RTIEYLEEV	"++++"
253	RVPPPPQSV	"++"
254	RVQEIAIEV	"++++"
255	SLFGQDVKAV	"++++"
256	SLFQGVEFHVY	"++++"
257	SLLEKAGPEL	"++++"
258	SLMGPVVHEV	"++++"
259	TLITDGMRSV-	"++"
260	TLMDMRLSQV	"++++"
261	VLFQEALWHV	"++++"
262	VLPNFLPYNV	"++++"
263	VLYPSLKEI	"++++"
264	VMQDPEFLQSV	"++++"
265	WLIEDGKVVTV	"++++"
266	SLLESNKDLLL	"++++"
267	ALNENINQV	"++++"
268	KLYQEVEIASV	"++++"
269	YLMEGSYNKV	"++++"
270	SVLDQKILL	"++++"
271	LLLDKLILL	"++++"
272	QQLDSKFLEQV	"++++"
273	AILETAPKEV	"++++"
274	ALAEALKEV	"++++"
275	ALIEGAGILL	"++++"
276	ALLEADVNIKL	"++++"
277	ALLEENSTPQL	"++++"
278	ALTSVVVTL	"++++"
279	ALWTGMHTI	"++++"
280	ATLNIIHSV	"++++"
281	GLLAGDRLVEV	"++++"
282	GQFPSYLETV	"++++"
283	ILSGIGVSQV	"++++"
284	KLDAFVEGV	"++++"

SEQ ID No	Последовательность	Пептидный обмен
285	KLLDLSDESTSV	"+++"
286	KVLDKVFRA	"++++"
287	LIGEFLEKV	"++++"
288	LLDDSLVSI	"+++"
290	NLIDLDDLYV	"++++"
291	QLIDYERQL	"+++"
292	RIPAYFVTV	"++"
293	FLASESLIKQI	"++"
294	RLIDLHTNV	"++++"
295	SLFSSPPEI	"+++"
296	SLLSGRISTL	"+++"
297	TLFYSLREV	"+++"
298	TMAKESSIIGV	"++"
299	ALLRVTPFI	"++++"
300	TLAQQPTAV	"++"
302	KIQEILTQV	"++++"

ПРИМЕР 4:

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

Для получения информации об иммуногенности пептидов TUMAP по настоящему изобретению заявители провели исследования с использованием прайминга Т-клеток *in vitro* на основе повторных стимуляций CD8+ Т-клеток искусственными антигенпрезентирующими клетками (иАПК), нагруженными комплексами пептид-МНС и антителом к CD28. Таким образом заявители могли показать иммуногенность для пока что 22 рестриктированных по HLA-A*0201 пептидов TUMAP по изобретению, демонстрируя, что эти пептиды являются Т-клеточными эпитопами, против которых у человека имеются CD8+ Т-клетки-предшественники (Таблица 11).

Прайминг CD8+ Т-клеток *in vitro*

В целях проведения стимуляций *in vitro* искусственными антигенпрезентирующими клетками, нагруженными комплексом пептид-МНС (pMHC) и антителом к CD28, заявители сначала выделили CD8+ Т-клетки из свежего продукта лейкофереза HLA-A*02 методом позитивной селекции с помощью микросфер CD8 (Miltenyi

Biotec, Бергиш-Гладбах, Германия). Кровь была получена от здоровых доноров (после подписания формы информированного согласия) из Университетской клиники г. Мангейм, Германия.

МКПК и выделенные CD8⁺ лимфоциты инкубировали до использования в Т-клеточной среде (TCM), состоящей из RPMI-Glutamax (Invitrogen, Карлсруэ, Германия) с добавлением 10% инактивированной нагреванием человеческой сыворотки АВ (PAN-Biotech, Эйденбах, Германия), 100 Ед/мл пенициллина / 100 мкг/мл стрептомицина (Cambrex, 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 из модифицированного Melan-A/MART-1) и A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI из DDX5), 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% специфических мультимер-положительных среди CD8-положительных Т-клеток и процентная доля специфических мультимер-положительных клеток была по меньшей мере в 10 раз выше медианного значения стимуляций отрицательного контроля).

Иммуногенность *in vitro* для пептидов ГКК

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 трех пептидов по изобретению показаны на Фигуре 3 и Фигуре 4 вместе с соответствующими отрицательными контролями. Результаты для 22 пептидов по изобретению обобщаются в Таблице 11А.

Таблица 11А: Иммуногенность *in vitro* пептидов HLA I класса по изобретению
Отдельные результаты экспериментов по иммуногенности *in vitro*, проведенных заявителем для пептидов по изобретению. <20 % = +; 20 % - 49 % = ++; 50 % - 69 % = +++; >= 70 % = ++++

Seq ID	Ид. № пептида	лунки	доноры
225	QAR-001	+++	++++
1	APOB-003	++	++++
2	ALDH1L1-001	++	++++
301	C1QTNF3-001	++	++++
15	SLC35B2-001	++	++++
16	ACSL3-001	++	++++
12	GPC3-001	+	++++
7	APOB-002	+	++++
303	MAGEB2-001	+	++
227	SAMM-001	+	+++
4	APOB-004	+	++++
226	THT-001	+	++++
6	AXIN2-001	+	++
232	MAPKAPK5-001	+	+++
10	USO-001	+	++
304	USP14-001	+	++++
219	ADF-012	+	++++
224	IFT81-001	+	+++
11	ZNF318-001	+	++
14	NCST-001	+	++
228	ACSL4-001	+	++
230	IPO9-001	+	++++

Таблица 11Б: Иммуногенность *in vitro* дополнительных пептидов HLA I класса по изобретению

Отдельные результаты экспериментов по иммуногенности *in vitro*, проведенных заявителем для рестриктированных по HLA-A*24 пептидов по изобретению. Указаны результаты экспериментов по иммуногенности *in vitro*. Процентные доли положительных лунок и доноров (среди подлежащих оценке) обобщено согласно следующему критерию: 1 – 20 % = +; 20 % – 49 % = ++; 50 % – 69 % = +++; >= 70 % = ++++

SEQ ID No	Последовательность	Положительные лунки [%]	Положительные доноры [%]
187	SYPTFFPRF	"+"	"++++"
189	AFSPDSHYLLF	"+"	"++"
190	RYNEKCFKL	"+"	"++"
191	KYPDIIISRI	"+"	"++++"
192	SYITKPEKW	"+"	"++++"
193	IYPGAFVDL	"+"	"++++"
194	QYASRFVQL	"+"	"++++"
196	AYLKWISQI	"+"	"++++"
197	RWPKKSAEF	"+"	"++"
198	LYWSHPRKF	"+"	"++"
199	KFVTVQATF	"+"	"++"
201	AYVNTFHNI	"++"	"++++"
202	AYGTYRSNF	"+"	"++++"
203	YYGILQEKI	"+"	"++++"
205	VYGLQRNLL	"+"	"++++"
207	IYLERFPIF	"++"	"++++"
208	SYNPAENAVLL	"+"	"++++"
209	VFHPRQELI	"++"	"++++"
210	AYPAIRYLL	"+"	"++++"
211	IYIPSYFDF	"++"	"++++"
212	VYGDVISNI	"+"	"++++"
215	IYTGNISSF	"+"	"++"
216	IYADVGEEF	"+"	"++"
217	DYIPYVFKL	"+++"	"++++"
218	VYQGAIHQI	"+"	"++++"

Отдельные результаты пептид-специфических Т-клеточных ответов CD8+ *in vitro* здорового HLA-A*02+ донора (Фигура 3)

CD8⁺ Т-клетки праймировали с помощью искусственных АПК, стимулированных моноклональными антителами к CD28 и HLA-A*02 в комплексе с пептидом IMA-APOB-002 (Seq ID No 7) (А, правая секция) или пептидом IMA-APOB-003 (В, правая секция, Seq ID No 1) или пептидом IMA-ALDH1L1-001 (С, правая секция, Seq ID No 2), соответственно. После трех циклов стимуляции обнаружение клеток, реагирующих с пептидом, производилось с помощью двойного окрашивания мультимерами A*02/APOB-002 (А) или A*02/APOB-003 (В) или A*02/ALDH1L1-001. Левые секции (А, В, С) представляют собой контрольное окрашивание клеток, простимулированных нерелевантными комплексами пептида и A*02. Из числа отдельных жизнеспособных клеток путем гейтирования выделяли CD8⁺ лимфоциты. Гейты Буля помогали исключить ложно-положительные ответы, обнаруженные с помощью мультимеров, специфических в отношении различных пептидов. Указывается частота выявления специфических мультимер⁺ клеток среди CD8⁺ лимфоцитов.

Отдельные результаты пептид-специфических Т-клеточных ответов CD8⁺ *in vitro* здорового HLA-A*24⁺ донора (Фигура 4)

CD8⁺ Т-клетки праймировали с помощью искусственных АПК, стимулированных моноклональными антителами к CD28 и HLA-A*24 в комплексе с пептидом IMA-KLHL24-001 (Seq ID No 190) (А, правая секция) или пептидом IMA-APOB-006 (В, правая секция, Seq ID No 218), соответственно. После трех циклов стимуляции обнаружение клеток, реагирующих с пептидом, производилось с помощью двойного окрашивания мультимеров A*24/KLHL24-001 (А) или A*24/APOB-006 (В). Левые секции (А и В) представляют собой контрольное окрашивание клеток, простимулированных нерелевантными комплексами пептида и A*24. Из числа отдельных жизнеспособных клеток путем гейтирования выделяли CD8⁺ лимфоциты. Гейты Буля помогали исключить ложно-положительные ответы, обнаруженные с помощью мультимеров, специфических в отношении различных пептидов. Указывается частота выявления специфических мультимер⁺ клеток среди CD8⁺ лимфоцитов.

Пример 5: 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.

Список цитируемой литературы

- Adler, A. S. et al., *Genes Dev.* **28** (2014)
- Ahn, Y. H. et al., *J Proteomics.* **106** (2014)
- Akiyama, H. et al., *Oncol Rep.* **21** (2009)
- Alam, S. M. et al., *Endocr.Relat Cancer* **16** (2009)
- Aleman, G. et al., *Am J Physiol Endocrinol.Metab* **289** (2005)
- Alexanian, A. et al., *Cancer Genomics Proteomics.* **9** (2012)
- Altenhofer, S. et al., *J Biol.Chem.* **285** (2010)
- Alvarez, C. et al., *J Biol.Chem.* **276** (2001)
- Ammerpohl, O. et al., *Int.J Cancer* **130** (2012)
- Andersen, R. S. et al., *Nat.Protoc.* **7** (2012)
- Arai, E. et al., *Carcinogenesis* **33** (2012)
- Araki, T. et al., *J Biol.Chem.* **286** (2011)
- Arlt, A. et al., *Oncogene* **28** (2009)
- Arndt, S. et al., *Oncol Rep.* **18** (2007)
- Arner, E. S. et al., *Eur.J Biochem.* **267** (2000)
- Atienza, J. M. et al., *Mol Cancer Ther* **4** (2005)
- Avery-Kiejda, K. A. et al., *BMC.Cancer* **14** (2014)

- Bachmann, S. B. et al., Mol Cancer **13** (2014)
- Balogh, K. et al., Oncogene **31** (2012)
- Bani, M. R. et al., Mol Cancer Ther **3** (2004)
- Bansal, N. et al., PLoS.One. **6** (2011)
- Barbarulo, A. et al., Oncogene **32** (2013)
- Bell, J. C. et al., Drug Metab Dispos. **40** (2012)
- Ben-Izhak, O. et al., Histopathology **41** (2002)
- Bergada, L. et al., Lab Invest **94** (2014)
- Bergeron, M. J. et al., Mol Aspects Med. **34** (2013)
- Bhattacharya, C. et al., Mol Cancer **11** (2012)
- Bhogaraju, S. et al., Science **341** (2013)
- Bidkhor, G. et al., PLoS.One. **8** (2013)
- Bieche, I. et al., Breast Cancer Res **6** (2004)
- Biswas, S. et al., Biochim.Biophys.Acta **1832** (2013)
- Blanke, K. L. et al., Cancer Causes Control **25** (2014)
- Bodine, S. C. et al., Science **294** (2001)
- Boehringer, J. et al., Biochem.J **448** (2012)
- Bojjireddy, N. et al., J Cell Sci. (2014)
- Booth, D. G. et al., EMBO J **30** (2011)
- Bouquet, C. et al., Mol Ther **14** (2006)
- Boylan, K. L. et al., Proteome.Sci. **8** (2010)
- Braumuller, H. et al., Nature (2013)
- Brockmoller, S. F. et al., J Proteome.Res **11** (2012)
- Buch, S. C. et al., Mol Carcinog. **51 Suppl 1** (2012)
- Bull, C. et al., Cancer Res **74** (2014)

- Burrell, R. A. et al., Nature **494** (2013)
- Butterfield, L. H. et al., Clin Cancer Res **12** (2006)
- Butterfield, L. H. et al., Clin.Cancer Res. **9** (2003)
- Byrne, A. et al., Exp.Cell Res **316** (2010)
- Cadenas, C. et al., Cell Cycle **13** (2014)
- Cadore, A. et al., Oncogene **21** (2002)
- Cao, H. et al., Biochemistry **41** (2002)
- Cao, Y. et al., Cancer Research **61** (2001)
- Cao-Ehlker, X. et al., J Biol.Chem. **288** (2013)
- Carroll, M. et al., J Interferon Cytokine Res **33** (2013)
- Carrouel, F. et al., J Dent.Res **87** (2008)
- Castro, M. et al., J Transl.Med. **8** (2010)
- Chae, Y. S. et al., Med.Oncol **28** (2011)
- Chang, L. O. et al., Cancer Res **33** (1973)
- Chang, Y. S. et al., Cancer Chemother.Pharmacol. **59** (2007)
- Chapiro, J. et al., Radiol.Med. **119** (2014)
- Charbonneau, B. et al., Am J Hematol. **87** (2012)
- Chatterjee, M. et al., Haematologica **98** (2013)
- Chen, J. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. **420** (2012a)
- Chen, M. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **108** (2011a)
- Chen, R. et al., World J Gastroenterol. **17** (2011b)
- Chen, X. et al., J Dig.Dis. **12** (2011c)
- Chen, X. Q. et al., Med.Oncol **29** (2012b)
- Cheng, L. et al., Genomics **102** (2013)
- Choi, Y. W. et al., Int.J Gynecol.Cancer **17** (2007)

- Christa, L. et al., *Gastroenterology* **106** (1994)
- Clark, A. G. et al., *Cytoskeleton (Hoboken.)* **69** (2012)
- Claro da, Silva T. et al., *Mol.Aspects Med.* **34** (2013)
- Cohen, L. et al., *Nature* **395** (1998)
- Collins, C. L. et al., *Surgery* **122** (1997)
- Com, E. et al., *J Proteomics.* **75** (2012)
- Copps, K. D. et al., *Diabetologia* **55** (2012)
- Cornen, S. et al., *PLoS.ONE.* **9** (2014)
- Cornez, I. et al., *Biochem.Pharmacol.* **75** (2008)
- Cowling, V. H., *Oncogene* **29** (2010)
- Cui, T. et al., *Int.J Oncol* **39** (2011)
- da Silva, M. G. et al., *Exp.Clin Cardiol.* **17** (2012)
- Dadkhah, E. et al., *Arch.Iran Med.* **16** (2013)
- Darmanis, S. et al., *PLoS.One.* **8** (2013)
- Darvekar, S. et al., *Biochem.J* **442** (2012)
- Darvekar, S. R. et al., *PLoS.One.* **9** (2014)
- Datta, K. et al., *J Biol.Chem.* **284** (2009)
- David, S. et al., *Front Biosci.(Elite.Ed)* **5** (2013)
- de Almagro, M. C. et al., *Biochem.Pharmacol.* **81** (2011)
- de Groot, J. F. et al., *Cancer Res* **65** (2005)
- Deb, S. et al., *Br.J Cancer* **110** (2014)
- Debaue, G. et al., *Cell Mol Life Sci.* **65** (2008)
- Decker, T. et al., *J Clin Invest* **109** (2002)
- Decock, A. et al., *Genome Biol.* **13** (2012)
- Del Campo, E. M. et al., *Mol Phylogenet.Evol.* **66** (2013)

- Delaval, B. et al., J Cell Biol. **188** (2010)
- Deng, X. D. et al., Asian Pac.J Cancer Prev. **15** (2014)
- Di, Gregorio E. et al., J Med.Genet. **50** (2013)
- Diggie, C. P. et al., PLoS.Genet. **10** (2014)
- Dimitrov, A. et al., Hum.Mol Genet. **18** (2009)
- Dmitriev, O. Y., Biochem.Cell Biol. **89** (2011)
- Doherty, J. A. et al., Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev. **20** (2011)
- Dong, Z. et al., Crit Rev.Oncol Hematol. **59** (2006)
- Dou, R. et al., Cancer Lett. **336** (2013)
- Drazkowska, K. et al., Nucleic Acids Res **41** (2013)
- Edavana, V. K. et al., Drug Metab Dispos. **41** (2013)
- Edwards, P. A. et al., Breast Cancer Res **14** (2012)
- Elvenes, J. et al., PLoS.One. **6** (2011)
- Emaduddin, M. et al., Cell Commun.Signal. **6** (2008)
- Enguita-German, M. et al., World J Hepatol. **6** (2014)
- Epelbaum, R. et al., Pathol.Oncol Res **4** (1998)
- Fan, T. W. et al., Mol Cancer **8** (2009)
- Fang, Z. Q. et al., Genet.Mol Res **12** (2013)
- Fassas, A. B. et al., Leuk.Lymphoma **45** (2004)
- Feferman, L. et al., Prostate Cancer Prostatic.Dis. **16** (2013)
- Fei, F. et al., J Cancer Res Clin Oncol (2014a)
- Fei, F. et al., Ann Surg.Oncol **21** (2014b)
- Feigelson, H. S. et al., Breast Cancer Res **10** (2008)
- Feng, L. et al., Cell Biochem.Funct. **29** (2011)
- Feng, M. et al., J Clin Invest **124** (2014a)

- Feng, S. et al., *Int.J Biol.Sci.* **9** (2013)
- Feng, Y. et al., *J Biol.Chem.* **289** (2014b)
- Feng, Y. et al., *Free Radic.Res* **46** (2012)
- Fernandes, C. F. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* **361** (2007)
- Ferre, S. et al., *J Am Soc Nephrol.* **25** (2014)
- Ferrer-Ferrer, M. et al., *Arch.Med.Res* **44** (2013)
- Filmus, J. et al., *FEBS J* **280** (2013)
- Fiorito, V. et al., *Biochim.Biophys.Acta* **1839** (2014)
- Fojo, A. T. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84** (1987)
- Fonseca, A. L. et al., *Genes Chromosomes.Cancer* **51** (2012)
- Fossdal, G. et al., *ScientificWorldJournal.* **2012** (2012)
- Fournier, T. et al., *Biochim.Biophys.Acta* **1482** (2000)
- Fu, W. et al., *J Cell Sci.* **123** (2010)
- Fujitomo, T. et al., *Cancer Res* **72** (2012)
- Furukawa, T. et al., *Sci.Rep.* **1** (2011)
- Furutani, M. et al., *Hepatology* **24** (1996)
- Gadd, S. et al., *Lab Invest* **90** (2010)
- Gailani, D., *Trends Cardiovasc.Med.* **10** (2000)
- Galamb, O. et al., *Helicobacter.* **13** (2008)
- Galazis, N. et al., *Gynecol.Endocrinol.* **29** (2013)
- Gandhi, A. V. et al., *Ann Surg.Oncol* **20 Suppl 3** (2013)
- Gao, L. et al., *Mol Oncol* **6** (2012)
- Garcia-Baquero, R. et al., *Tumour.Biol.* **35** (2014)
- Gardner-Stephen, D. A. et al., *Drug Metab Dispos.* **35** (2007)
- Garg, M. et al., *Cancer* **116** (2010a)

- Garg, M. et al., *Eur.J Cancer* **46** (2010b)
- Gburcik, V. et al., *Mol Cell Biol.* **25** (2005)
- Gergely, F. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97** (2000)
- Gervasini, G. et al., *Cancer* **107** (2006)
- Getty, A. L. et al., *Cell Mol Life Sci.* **68** (2011)
- Gilabert, M. et al., *J Cell Physiol* **228** (2013)
- Gilkes, D. M. et al., *Mol Cancer Res* **11** (2013)
- Giovannetti, E. et al., *J Natl.Cancer Inst.* **106** (2014)
- Gokmen-Polar, Y. et al., *Mod.Pathol.* (2014)
- Goldstein, I. et al., *Carcinogenesis* **34** (2013)
- Gong, Y. et al., *Genet.Mol Res* **12** (2013)
- Goode, E. L. et al., *Clin Cancer Res* **16** (2010)
- Gordon, E. M. et al., *Am.J Pediatr.Hematol.Oncol* **15** (1993)
- Gotzmann, J. et al., *Crit Rev.Eukaryot.Gene Expr.* **9** (1999)
- Gray, L. R. et al., *Cell Mol Life Sci.* **71** (2014)
- Gregory, P. A. et al., *J Biol.Chem.* **278** (2003)
- Greif, P. A. et al., *Leukemia* **25** (2011)
- Gu, W. et al., *PLoS.One.* **7** (2012)
- Guo, L. et al., *Cancer Sci.* **103** (2012)
- Halon, A. et al., *Arch.Gynecol.Obstet.* **287** (2013)
- Hamamoto, R. et al., *Cancer Sci.* **97** (2006)
- Hamilton, S. R. et al., *Glycobiology* **15** (2005)
- Hamm, A. et al., *BMC.Cancer* **8** (2008)
- Hanioka, N. et al., *Basic Clin Pharmacol.Toxicol.* **110** (2012)
- Harris, M. et al., *Pharmacogenet.Genomics* **24** (2014)

- Hatakeyama, H. et al., *Proteomics*. **6** (2006)
- Havens, M. A. et al., *PLoS.Genet.* **10** (2014)
- He, P. et al., *Hum.Pathol.* **35** (2004)
- He, X. et al., *Neoplasma* **61** (2014a)
- He, Y. et al., *Mol Carcinog.* (2014b)
- Hellwinkel, O. J. et al., *Prostate Cancer Prostatic.Dis.* **14** (2011)
- Hemmingsson, O. et al., *Oncol Rep.* **22** (2009)
- Hidalgo-Curtis, C. et al., *Br.J Haematol.* **148** (2010)
- Hider, J. L. et al., *BMC.Evol.Biol.* **13** (2013)
- Hirsch, N. et al., *BMC.Cancer* **9** (2009)
- Hirota, Y. et al., *Nucleic Acids Res* **28** (2000)
- Hlavata, I. et al., *Mutagenesis* **27** (2012)
- Hoelz, D. J. et al., *Proteomics*. **6** (2006)
- Holden, H. M. et al., *Cell Mol Life Sci.* **61** (2004)
- Honda, K. et al., *PLoS.One.* **7** (2012)
- Hong, Y. et al., *J Biol.Chem.* **274** (1999)
- Hood, F. E. et al., *Bioarchitecture.* **1** (2011)
- Hood, F. E. et al., *J Cell Biol.* **202** (2013)
- Hopfer, O. et al., *Br.J Cancer* **93** (2005)
- Horani, A. et al., *Am J Hum.Genet.* **91** (2012)
- Hou, M. et al., *Int.J Mol Med.* **33** (2014)
- Hu, D. G. et al., *Drug Metab Rev.* **46** (2014)
- Hua, D. et al., *Int.J Mol Med.* **30** (2012a)
- Hua, T. et al., *J Biol.Chem.* **287** (2012b)
- Huang, O. et al., *Jpn.J Clin Oncol* **43** (2013)

- Huang, S. et al., *Oncogene* **21** (2002)
- Huang, Y. et al., *Oncotarget*. **5** (2014)
- Hughes, H. et al., *J Cell Sci.* **123** (2010)
- Hunecke, D. et al., *J Pathol.* **228** (2012)
- Huopaniemi, L. et al., *Glycobiology* **14** (2004)
- Hyung, S. W. et al., *Mol Cell Proteomics.* **10** (2011)
- Iannitti, T. et al., *Mar.Drugs* **8** (2010)
- Ichida, K. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* **282** (2001)
- Ignatova, I. D. et al., *Am J Physiol Endocrinol.Metab* **296** (2009)
- Ikeda, R. et al., *Int.J Oncol* **38** (2011)
- Inuzuka, M. et al., *J Biol.Chem.* **280** (2005)
- Ishiguro, H. et al., *Oncogene* **21** (2002)
- Ishizaki, F. et al., *Sci.Rep.* **3** (2013)
- Ivashchenko, A. T. et al., *Biomed.Res Int.* **2013** (2013)
- Jacquemier, J. et al., *Cancer Res* **65** (2005)
- Jacques, C. et al., *Br.J Cancer* **101** (2009)
- Jaffe, E. K. et al., *Arch.Biochem.Biophys.* **530** (2013)
- Jakobsson, A. et al., *Prog.Lipid Res* **45** (2006)
- Jamroziak, K. et al., *Eur.J Haematol.* **72** (2004)
- Jeung, H. C. et al., *Oncologist.* **12** (2007)
- Jia, Y. et al., *Br.J Cancer* **110** (2014)
- Jiang, J. G. et al., *Cancer Res* **65** (2005)
- Jiang, X. et al., *Histol.Histopathol.* **25** (2010)
- Jiang, X. et al., *Mol Carcinog.* (2014)
- Jin, Z. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* **7** (2014)

- Jockusch, H. et al., *Proteomics*. **14** (2014)
- Johnson, M. A. et al., *Ann N.Y.Acad.Sci.* **1012** (2004)
- Jose-Eneriz, E. S. et al., *Br.J Haematol.* **142** (2008)
- Jung, G. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* **84** (1987)
- Jung, H. J. et al., *J Mol Med.(Berl)* **91** (2013)
- Kaira, K. et al., *Hepatobiliary.Pancreat.Dis.Int.* **13** (2014)
- Kalsotra, A. et al., *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **199** (2004)
- Kalthoff, S. et al., *J Biol.Chem.* **285** (2010)
- Kamiyama, S. et al., *Glycobiology* **21** (2011)
- Kamiyama, S. et al., *J Biol.Chem.* **281** (2006)
- Kandil, D. H. et al., *Adv.Anat.Pathol.* **16** (2009)
- Kandimalla, R. et al., *Nat Rev.Urol.* **10** (2013)
- Karvonen, U. et al., *J Mol Biol.* **382** (2008)
- Kelleher, D. J. et al., *Glycobiology* **16** (2006)
- Khan, A. P. et al., *Neoplasia.* **15** (2013)
- Kim, Y. et al., *Hum.Pathol.* **46** (2015)
- Kim, Y. W. et al., *PLoS.One.* **7** (2012)
- Klein, C. J. et al., *Neurology* **82** (2014)
- Kobayashi, T. et al., *Biochem.J* **400** (2006)
- Kollmann, K. et al., *Cancer Cell* **24** (2013)
- Komatsu, M. et al., *Pharmacol.Res* **66** (2012)
- Kong, S. Y. et al., *Cancer Sci.* **99** (2008)
- Kovacevic, Z. et al., *Biochim.Biophys.Acta* **1783** (2008)
- Kracmarova, A. et al., *Leuk.Lymphoma* **49** (2008)
- Kraemer, N. et al., *Cell Mol Life Sci.* **68** (2011)

- Kress, T. R. et al., Mol Cell **41** (2011)
- Krohn, A. et al., J Pathol. **231** (2013)
- Krupenko, S. A. et al., Cell Growth Differ. **13** (2002)
- Kubota, H. et al., Cell Stress.Chaperones. **15** (2010)
- Kummel, D. et al., EMBO Rep. **6** (2005)
- Kunutsor, S. K. et al., Int.J Cancer (2014)
- Kuriyama, H. et al., Gene **253** (2000)
- Laezza, F. et al., Mol Cell Neurosci. **34** (2007)
- Lahiri, S. et al., PLoS.Biol. **12** (2014)
- Lando, M. et al., J Pathol. **230** (2013)
- Lapucci, A. et al., FASEB J **24** (2010)
- Lascorz, J. et al., BMC.Med.Genet. **13** (2012)
- Lauffart, B. et al., BMC.Womens Health **5** (2005)
- Laverdiere, I. et al., Endocr.Relat Cancer (2014)
- Leasure, C. D. et al., Plant Physiol **150** (2009)
- Lee, C. H. et al., Hum.Reprod. **24** (2009)
- Lee, K. W. et al., J Biol.Chem. **288** (2013)
- Lee, S. J. et al., Toxicol.Lett. (2014)
- Lee, W. C. et al., J Immunother. **28** (2005)
- Lee, Y. C. et al., Int.J Cancer **122** (2008)
- Lekva, T. et al., PLoS.One. **8** (2013)
- LeRoy, P. J. et al., Cancer Res **67** (2007)
- Leung, T. et al., Breast Cancer Res **15** (2013)
- Levenson, V. V. et al., Somat.Cell Mol Genet. **25** (1999)
- Levi, S. et al., Front Pharmacol. **5** (2014)

- Li, D. et al., Protein Cell **5** (2014a)
- Li, N. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. **455** (2014)
- Li, X. et al., Med.Oncol **31** (2014b)
- Li, Y. et al., Mol Cell Biol. **29** (2009)
- Li, Y. H. et al., World J Gastroenterol. **18** (2012)
- Liang, J. et al., PLoS.One. **3** (2008)
- Lillig, C. H. et al., Antioxid.Redox.Signal. **9** (2007)
- Lin, C. H. et al., J Cell Biol. **189** (2010)
- Lin, M. C. et al., Oral Oncol **50** (2014)
- Lin, S. H. et al., Oncogene **23** (2004)
- Lin, Z. et al., Cell Rep. **5** (2013)
- Linderoth, J. et al., Br.J Haematol. **141** (2008)
- Line, A. et al., Cancer Immunol Immunother. **51** (2002)
- Ling, C. et al., EMBO J **26** (2007)
- Linge, A. et al., J Proteome.Res **13** (2014)
- Lioutas, A. et al., EMBO Rep. **14** (2013)
- Liu, C. et al., Nat Med. **20** (2014)
- Liu, C. et al., J Natl.Cancer Inst. **105** (2013a)
- Liu, H. et al., Carcinogenesis **34** (2013b)
- Liu, T. W. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **106** (2009a)
- Liu, W. et al., J Biol.Chem. **279** (2004)
- Liu, Y. et al., Curr.Drug Targets. **13** (2012)
- Liu, Y. et al., Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev. **18** (2009b)
- Liu, Y. et al., Oncol Rep. **18** (2007)
- Ljungberg, B., Curr.Opin.Urol. **17** (2007)

- Llovet, J. M. et al., *N.Engl.J Med.* **359** (2008)
- Lo Re, A. E. et al., *J Biol.Chem.* **287** (2012)
- Lo, W. Y. et al., *J Proteome.Res* **6** (2007)
- Lombardo, Y. et al., *Breast Cancer Res* **16** (2014)
- Lourenco, G. J. et al., *Breast Cancer Res Treat.* **100** (2006)
- Lovelace, L. L. et al., *J Biol.Chem.* **286** (2011)
- Lung, H. L. et al., *Int J Cancer* **127** (2010)
- Lutcke, H., *Eur.J Biochem.* **228** (1995)
- Ma, X. J. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100** (2003)
- Mackiewicz, A. et al., *Glycoconj.J* **12** (1995)
- Mahajan, K. et al., *Cancer Lett.* **338** (2013)
- Mamtani, M. et al., *BMC.Res Notes* **5** (2012)
- Mariani, L. et al., *Clin Cancer Res* **7** (2001)
- Marina, M. et al., *Front Biosci.(Landmark.Ed)* **19** (2014)
- Markiewski, M. M. et al., *Nat Immunol* **9** (2008)
- Martin, T. A. et al., *Eur.J Cancer* **40** (2004)
- Martinez, H. D. et al., *Genes Cancer* **2** (2011)
- Mathison, J. et al., *Pathobiology* **59** (1991)
- Matsubara, J. et al., *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **20** (2011)
- Matusiak, D. et al., *J Histochem.Cytochem.* **55** (2007)
- McGuire, T. A., *Md Med.J* **40** (1991)
- Medjkane, S. et al., *Cell Cycle* **11** (2012)
- Meijers, J. C. et al., *Br.J Haematol.* **108** (2000)
- Mercer, C. A. et al., *Autophagy.* **5** (2009)
- Mercurio, F. A. et al., *Biochemistry* **51** (2012)

- Midorikawa, Y. et al., Jpn.J Cancer Res. **93** (2002)
- Miled, C. et al., Cancer Res **65** (2005)
- Milkereit, P. et al., J Biol.Chem. **278** (2003)
- Miller, J. C. et al., Mol Carcinog. **48** (2009)
- Mohelnikova-Duchonova, B. et al., Pancreas **42** (2013)
- Monaco, M. E. et al., Transl.Oncol **3** (2010)
- Morandi, F. et al., PLoS.One. **7** (2012)
- Morrissey, J. J. et al., Urology **83** (2014)
- Mu, J. et al., J Biol.Chem. **272** (1997)
- Murray, D. W. et al., Br.J Cancer **110** (2014)
- Murray, J. I. et al., Mol Biol.Cell **15** (2004)
- Murrin, L. C. et al., J Neuroimmune.Pharmacol. **2** (2007)
- Murthy, K. G. et al., Genes Dev. **9** (1995)
- Mydlikova, Z. et al., Neoplasma **57** (2010)
- Narita, T. et al., Mol Cell Biol. **23** (2003)
- Narjoz, C. et al., PLoS.One. **9** (2014)
- Nelson, E. R. et al., Science **342** (2013)
- Ngeow, J. et al., Cancer Discov. **4** (2014)
- Nibbe, R. K. et al., Mol.Cell Proteomics. **8** (2009)
- Nielsen, M. J. et al., Blood **108** (2006)
- Noda, T. et al., Hepatology **55** (2012)
- Noh, C. K. et al., Clin Biochem. **47** (2014)
- Ntikoudi, E. et al., Cancer Treat.Rev. **40** (2014)
- Nwosu, V. et al., Hum.Mol Genet. **10** (2001)
- Obholz, K. L. et al., Dev.Biol. **298** (2006)

- Oeffner, F. et al., *Am J Hum.Genet.* **84** (2009)
- Ofman, R. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* **281** (2001)
- Ohshima, K. et al., *Mol Biol.Evol.* **27** (2010)
- Oiso, S. et al., *Oncol Rep.* **31** (2014)
- Oji, Y. et al., *Int.J Oncol* **44** (2014)
- Osada, H. et al., *Int.J Cancer* **112** (2004)
- Otero-Rey, E. M. et al., *Oral Oncol* **44** (2008)
- Palmer, D. H. et al., *Hepatology* **49** (2009)
- Panico, F. et al., *Adv.Cancer Res* **105** (2009)
- Park, B. L. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* **363** (2007)
- Patel, M. R. et al., *Laryngoscope* **121** (2011)
- Patel, S. A. et al., *Br.J Cancer* (2014)
- Pattani, K. M. et al., *PLoS.ONE.* **7** (2012)
- Pavelec, D. M. et al., *Genetics* **183** (2009)
- Pawlowska, M. et al., *Drug Metab Dispos.* **41** (2013)
- Pehlivan, D. et al., *Eur.J Hum.Genet.* **22** (2014)
- Pei, Z. et al., *PLoS.One.* **8** (2013)
- Pellanda, H. et al., *Int.J Biochem.Cell Biol.* **44** (2012)
- Peng, R. et al., *J Cell Biol.* **157** (2002)
- Perera, S. et al., *J Muscle Res Cell Motil.* **33** (2012)
- Persaud-Sawin, D. A. et al., *Hum.Mol Genet.* **11** (2002)
- Peters, D. G. et al., *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **14** (2005)
- Pizon, V. et al., *J Cell Sci.* **115** (2002)
- Placke, T. et al., *Blood* **124** (2014)
- Plebani, R. et al., *Neoplasia.* **14** (2012)

- Poh, W. et al., Mol Cancer **11** (2012)
- Porkka, K. P. et al., Genes Chromosomes.Cancer **39** (2004)
- Pylypenko, O. et al., Mol Cell **11** (2003)
- Qi, L. et al., Cancer Res **74** (2014)
- Qin, Y. et al., Pigment Cell Melanoma Res **26** (2013)
- Quayle, S. N. et al., Neuro Oncol **14** (2012)
- Quek, H. H. et al., DNA Cell Biol. **16** (1997)
- Quidville, V. et al., Cancer Res **73** (2013)
- Rajadhyaksha, A. M. et al., Am.J Hum.Genet. **87** (2010)
- Rajasekaran, A. K. et al., Nucleic Acids Res **23** (1995)
- Rajendran, M. et al., Cancer Metastasis Rev. **29** (2010)
- Rakheja, D. et al., Mol Genet.Metab **93** (2008)
- Ramana, C. V. et al., EMBO J **19** (2000)
- Rashad, N. M. et al., Cytokine **68** (2014)
- Rath, N. et al., EMBO Rep. **13** (2012)
- Recupero, D. et al., Rom.J Morphol.Embryol. **51** (2010)
- Reinisch, W. et al., J Immunother. **25** (2002)
- Rekdal, C. et al., J Biol.Chem. **275** (2000)
- Ren, Y. G. et al., Mol Biol.Cell **15** (2004)
- Rennoll, S. A. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. **443** (2014)
- Rifas, L. et al., Arthritis Rheum. **60** (2009)
- Riihila, P. M. et al., J Invest Dermatol. **134** (2014)
- Rodriguez, F. J. et al., J Neuropathol.Exp.Neurol. **67** (2008)
- Rogov, V. et al., Mol Cell **53** (2014)
- Romanuik, T. L. et al., BMC.Genomics **10** (2009)

- Roodman, G. D., *Ann N.Y.Acad.Sci.* **1192** (2010)
- Rosado, I. V. et al., *RNA.* **10** (2004)
- Rose, A. E. et al., *Cancer Res* **71** (2011)
- Ross, H. et al., *Arch.Pathol.Lab Med.* **136** (2012)
- Rossi, M. R. et al., *Cancer Genet.Cytogenet.* **161** (2005)
- Rotondo, R. et al., *Int.J Cancer* **125** (2009)
- Rucksaken, R. et al., *Cancer Biomark.* **12** (2012)
- Ruiz, F. X. et al., *Biochem.J* **440** (2011)
- Ruiz, F. X. et al., *Front Pharmacol.* **3** (2012)
- Rutkowski, M. J. et al., *Mol Cancer Res* **8** (2010)
- Rylova, S. N. et al., *Cancer Res* **62** (2002)
- Sahm, F. et al., *Cancer Res* **73** (2013)
- Sahu, A. et al., *Immunol Res* **17** (1998)
- Saito, T. et al., *J Biol.Chem.* **278** (2003)
- Salahshor, S. et al., *J Clin Pathol.* **58** (2005)
- Sang, W. et al., *Zhonghua Bing.Li Xue.Za Zhi.* **42** (2013)
- Sangro, B. et al., *J Clin Oncol* **22** (2004)
- Sanz, L. et al., *Mol Cell Biol.* **15** (1995)
- Saponaro, C. et al., *Cancer Biomark.* **14** (2014)
- Sarajlic, A. et al., *Breast Cancer Res Treat.* **143** (2014)
- Sasahira, T. et al., *Eur.J Cancer* **50** (2014)
- Schneider, E. et al., *Clin Chim.Acta* **374** (2006)
- Schofield, A. V. et al., *Crit Rev.Biochem.Mol Biol.* **48** (2013)
- Schulz, E. G. et al., *Immunity.* **30** (2009)
- Seifert, M. et al., *J Pathol.* **205** (2005)

- Senchenko, V. et al., *Oncogene* **22** (2003)
- Shaughnessy, J. D., Jr. et al., *Blood* **118** (2011)
- Shen, F. et al., *J Cell Biochem.* **112** (2011)
- Shi, M. et al., *World J Gastroenterol.* **10** (2004a)
- Shi, Y. et al., *Exp.Cell Res* **296** (2004b)
- Shi, Z. Z. et al., *Clin Transl.Oncol* **16** (2014)
- Shinji, S. et al., *Oncol Rep.* **15** (2006)
- Shodeinde, A. et al., *J Mol Biochem.* **2** (2013)
- Shubbar, E. et al., *BMC.Cancer* **13** (2013)
- Shurbaji, M. S. et al., *Am J Clin Pathol.* **96** (1991)
- Sillars-Hardebol, A. H. et al., *Gut* **61** (2012)
- Singh, S. et al., *Tumour.Biol.* (2014)
- Smith, P. et al., *Clin Cancer Res* **13** (2007)
- Song, C. et al., *J Biol.Chem.* **288** (2013)
- Srivenugopal, K. S. et al., *Cancer Lett.* **117** (1997)
- Staal-van den Brekel AJ et al., *Br.J Cancer* **76** (1997)
- Steen, H. C. et al., *J Interferon Cytokine Res.* **32** (2012)
- Stefanska, B. et al., *Clin Cancer Res* **20** (2014)
- Strassburg, C. P. et al., *J Biol.Chem.* **273** (1998)
- Strassburg, C. P. et al., *Mol Pharmacol.* **52** (1997)
- Sudo, H. et al., *Genomics* **95** (2010)
- Sugihara, T. et al., *J Biol.Chem.* **276** (2001)
- Sun, C. et al., *Pathol.Res Pract.* **210** (2014)
- Sun, X. et al., *J Pathol.* **226** (2012)
- Sun, X. et al., *Protein Cell* **4** (2013)

- Sun, X. J. et al., Zhonghua Yi.Xue.Yi.Chuan Xue.Za Zhi. **22** (2005)
- Supernat, A. et al., Oncol Lett. **4** (2012)
- Surmacz, E., J Mammary.Gland.Biol.Neoplasia. **18** (2013)
- Suzuki, K. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. **368** (2008)
- Swallow, C. J. et al., Oncogene **24** (2005)
- Tabuchi, K. et al., J Neurosci. **22** (2002)
- Taguchi, O. et al., Clin Chim.Acta **244** (1996)
- Takayama, T. et al., Cancer **68** (1991)
- Takayama, T. et al., Lancet **356** (2000)
- Takeda, Y. et al., Glycobiology **24** (2014)
- Takemasa, I. et al., Int.J Oncol **40** (2012)
- Takeuchi, A. et al., Mol Cell Endocrinol. **384** (2014)
- Tan, L. Z. et al., Am J Pathol. **183** (2013)
- Tan, M. K. et al., Mol Cell Biol. **31** (2011)
- Tanahashi, N. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. **243** (1998)
- Tanaka, M. et al., Mol Med.Rep. **7** (2013)
- Tang, L. et al., Arch.Med.Res **43** (2012)
- Tang, X. H. et al., Annu.Rev.Pathol. **6** (2011)
- Tao, J. et al., Sci.Transl.Med. **3** (2011)
- Tao, R. H. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. **341** (2006)
- Tao, T. et al., Cell Res **23** (2013)
- Tarao, K. et al., Cancer **86** (1999)
- Tarao, K. et al., Cancer **79** (1997)
- Tasker, P. N. et al., Osteoporos.Int. **17** (2006)
- Telikicherla, D. et al., Clin Proteomics. **9** (2012)

- Tian, T. et al., *Eur.J Cancer* **48** (2012)
- Tian, Y. et al., *BMC.Cancer* **14** (2014)
- Tomiyama, K. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **107** (2010)
- Tomoda, T. et al., *J Gastroenterol.Hepatol.* **27** (2012)
- Tong, J. et al., *PLoS.One.* **8** (2013)
- Tortorella, S. et al., *J Membr.Biol.* **247** (2014)
- Tran, E. et al., *Science* **344** (2014)
- Trougakos, I. P., *Gerontology* **59** (2013)
- Tsai, H. Y. et al., *Oncogene* **32** (2013)
- Uddin, S. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* **4** (2011)
- Uehara, Y. et al., *Cancer Res* **43** (1983)
- Urig, S. et al., *Semin.Cancer Biol.* **16** (2006)
- Vainio, P. et al., *Am.J Pathol.* **178** (2011)
- van der Spek, P. J. et al., *Genomics* **31** (1996)
- van Zuylen, W. J. et al., *PLoS.Pathog.* **8** (2012)
- van, den Broek, I et al., *Proteomics.Clin Appl.* **4** (2010)
- van, Duin M. et al., *Haematologica* **96** (2011)
- Vejda, S. et al., *Mol Cell Proteomics.* **1** (2002)
- Vincent, F. et al., *Cancer Res* **69** (2009)
- Wang, B. S. et al., *Cell Stress.Chaperones.* **18** (2013a)
- Wang, D. et al., *J Biol.Chem.* **277** (2002)
- Wang, J. et al., *Eur.J Cancer Prev.* **22** (2013b)
- Wang, J. et al., *J Clin Invest* **112** (2003)
- Wang, J. et al., *Cancer Prev.Res (Phila)* **6** (2013c)
- Wang, J. C. et al., *Oncology* **81** (2011)

- Wang, M. et al., Chin J Physiol **55** (2012)
- Wang, S. K. et al., PLoS.Genet. **9** (2013d)
- Wang, S. S. et al., PLoS.One. **5** (2010)
- Wang, X. et al., Urol.Int. **92** (2014)
- Wang, Y. et al., J Biol.Chem. **274** (1999)
- Wang, Y. et al., Med.Oncol **32** (2015)
- Wazir, U. et al., Cell Mol Biol.Lett. **18** (2013)
- Wazir, U. et al., Anticancer Res **32** (2012)
- Weiss, J. et al., Int.J Antimicrob.Agents **41** (2013)
- Welsh, M. M. et al., Carcinogenesis **29** (2008)
- Wieser, R., Leuk.Lymphoma **43** (2002)
- Wilhelm, S. M. et al., Cancer Res. **64** (2004)
- Williams, A. L. et al., Nature **506** (2014)
- Witte, I. et al., Cell Death.Dis. **2** (2011)
- Wong, K. K. et al., Leukemia **28** (2014)
- Wong, N. et al., J Hepatol. **38** (2003)
- Wu, L. et al., Ann Hematol. **91** (2012)
- Wu, N. et al., Int.J Mol Sci. **14** (2013a)
- Wu, W. et al., Sci.China Life Sci. **56** (2013b)
- Wu, X. et al., Am.J Clin Exp.Urol. **2** (2014)
- Wu, Y. M. et al., Cancer Res **71** (2011)
- Xiao, J. et al., J Biol.Chem. **276** (2001)
- Xie, F. W. et al., Neoplasma **61** (2014)
- Xu, H. et al., Cell Rep. **9** (2014)
- Xu, X. et al., Proteomics. **10** (2010)

- Yan, D. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **98** (2001)
- Yang, C. et al., Virchows Arch. **463** (2013)
- Yang, C. Y. et al., J Immunol **192** (2014a)
- Yang, H. et al., Oncol Rep. **24** (2010)
- Yang, H. W. et al., Oncogene **0** (2014b)
- Yang, R. et al., Mol Cell Biol. **31** (2011a)
- Yang, Z. J. et al., Mol Cancer Ther **10** (2011b)
- Yau, C. et al., Breast Cancer Res **12** (2010)
- Ye, X. H. et al., Mol Genet.Genomics (2014)
- Yoon, J. K. et al., J Transl.Med. **12** (2014)
- Yoshimura, S. et al., J Cell Biol. **191** (2010)
- Yoshizuka, N. et al., Mol Cancer Res **10** (2012)
- Yosten, G. L. et al., Am J Physiol Regul.Integr.Comp Physiol **303** (2012)
- Yu, J. H. et al., RNA. **11** (2005)
- Yu, K. et al., PLoS.Genet. **4** (2008)
- Yue, C. et al., Int.J Cancer **136** (2015)
- Zamanian-Daryoush, M. et al., J Biol.Chem. **288** (2013)
- Zarling, A. L. et al., Cancer Res **74** (2014)
- Zekri, A. R. et al., Asian Pac.J Cancer Prev. **13** (2012)
- Zelcer, N. et al., Mol Cell Biol. **34** (2014)
- Zhang, D. et al., Pak.J Med.Sci. **29** (2013a)
- Zhang, H. et al., Oncotarget. **4** (2013b)
- Zhang, H. T. et al., Biochim.Biophys.Acta **1839** (2014a)
- Zhang, J. et al., Drug Metab Dispos. **34** (2006)
- Zhang, S. et al., BMC.Cancer **11** (2011)

- Zhang, X. et al., PLoS.One. **7** (2012)
- Zhang, X. D. et al., Int.J Clin Exp.Med. **7** (2014b)
- Zhao, Y. et al., Cell Death.Dis. **4** (2013)
- Zhou, B. et al., Cancer Biol.Ther **13** (2012)
- Zhou, D. et al., PLoS.One. **8** (2013a)
- Zhou, J. et al., Oncol Rep. **30** (2013b)
- Zhou, J. et al., Lung Cancer **14** (1996)
- Zhu, H. et al., Cell Stress.Chaperones. (2014a)
- Zhu, W. L. et al., Anticancer Res **29** (2009)
- Zhu, X. et al., Biomed.Pharmacother. **68** (2014b)
- Zhuang, Z. et al., J Neurosurg. **115** (2011)
- Zietek, Z. et al., Pol.Tyg.Lek. **51** (1996)
- Zou, W. et al., Cancer Sci. **101** (2010)
- Zu, X. et al., Molecules. **18** (2013)
- Zu, X. Y. et al., Recent Pat Anticancer Drug Discov. **7** (2012)
- Zynda, E. R. et al., Cell Cycle **13** (2014)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептид, состоящий из аминокислотной последовательности GVYDGEENSV (SEQ ID NO: 303), где пептид представлен в виде фармацевтически приемлемой соли.

2. Пептид по п. 1, где фармацевтически приемлемая соль выбрана из соли соляной кислоты, соли уксусной кислоты и трифторацетатной соли.

3. Фармацевтическая композиция для лечения гепатоклеточной карциномы (ГКК), содержащая пептид, выбранный из группы, состоящей из

а) пептида, состоящего из последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 303, или его фармацевтически приемлемой соли,

б) пептида в соответствии с а), где указанный пептид включает непептидные связи; и

в) пептида в соответствии с а), где указанный пептид является частью слитого белка, включающего N-терминальные аминокислоты антиген-ассоциированной инвариантной цепи (Ii) HLA-DR, или слит с антителом (или встроен в последовательность антитела),

вместе по меньшей мере с одним подходящим носителем и/или вспомогательным веществом.

4. Фармацевтическая композиция, содержащая активированный цитотоксический Т-лимфоцит (ЦТЛ), полученный способом *in vitro*, включающим контактирование ЦТЛ *in vitro* с нагруженными антигеном молекулами МНС человека I класса, экспрессированными на поверхности подходящей антигенпрезентирующей клетки, в течение периода времени, достаточного для активации антиген-специфическим образом ЦТЛ, где указанный антиген является пептидом, состоящим из SEQ ID NO: 303, или его фармацевтически приемлемой солью, который селективно распознает клетку, которая aberrantly экспрессирует полипептид, включающий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 303, вместе по меньшей мере с одним подходящим носителем и/или вспомогательным веществом.

5. Антитело, которое является специфическим к комплексу МНС/пептид из МНС с пептидом, состоящим из SEQ ID NO: 303, или его фармацевтически приемлемой солью, для терапии на основе иммуноксина против рака, которым является гепатоклеточная карцинома (ГКК).

6. Антитело, которое является специфическим к комплексу МНС/пептид из МНС с пептидом, состоящим из SEQ ID NO: 303, или его фармацевтически приемлемой солью, для ELISA, иммуногистохимии и/или визуализации *in vivo* при раке, которым является гепатоклеточная карцинома (ГКК).

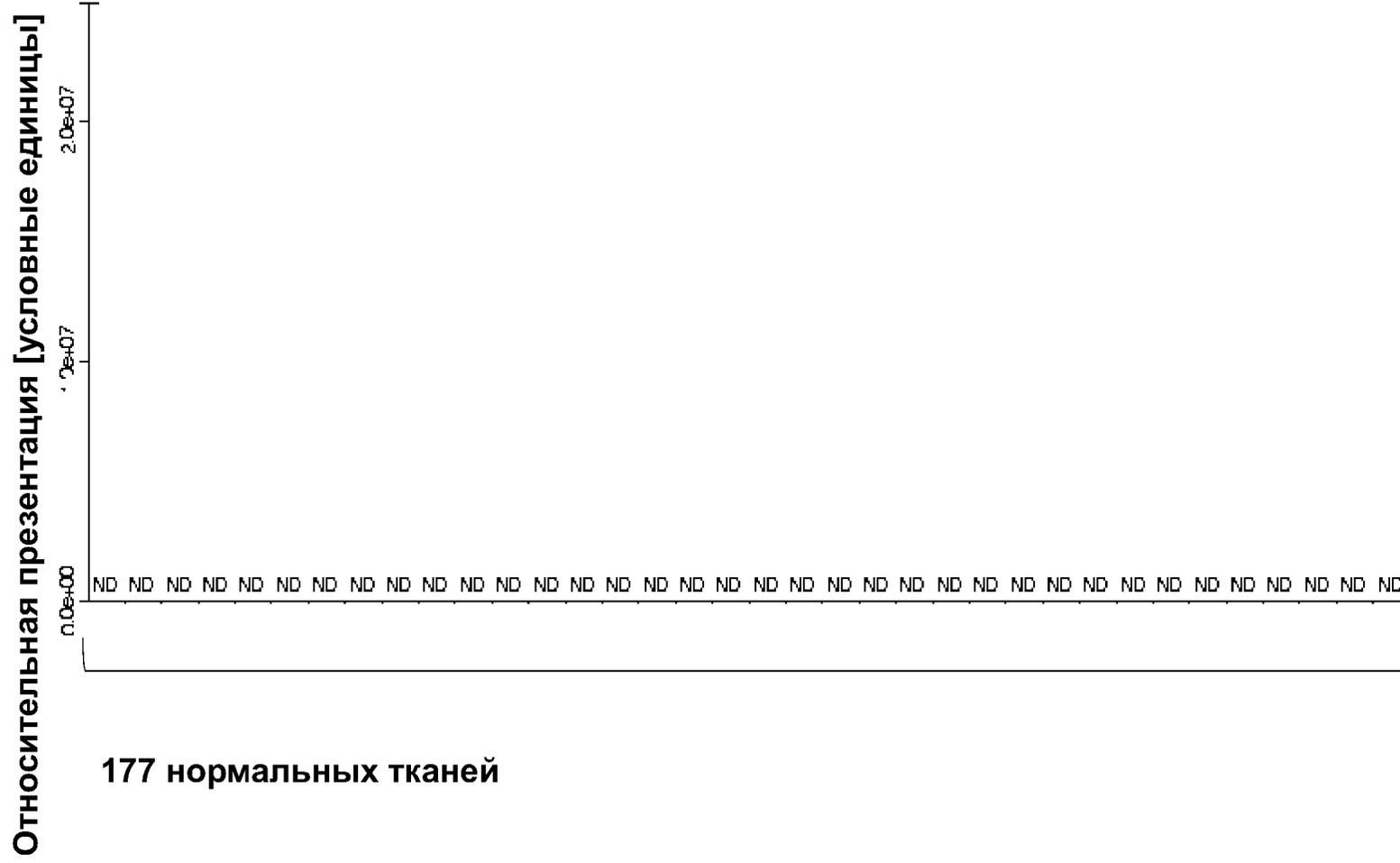
7. Т-клеточный рецептор (ТКР), растворимый или связанный с мембраной, который реагирует с HLA-лигандом, где указанный лиганд состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 303 или представляет собой его фармацевтически приемлемую соль.

8. Т-клеточный рецептор по п. 7, где лиганд является частью комплекса пептид-МНС.

9. Применение пептида, состоящего из последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 303, или его фармацевтически приемлемой соли для лечения и/или диагностики гепатоклеточной карциномы (ГКК).

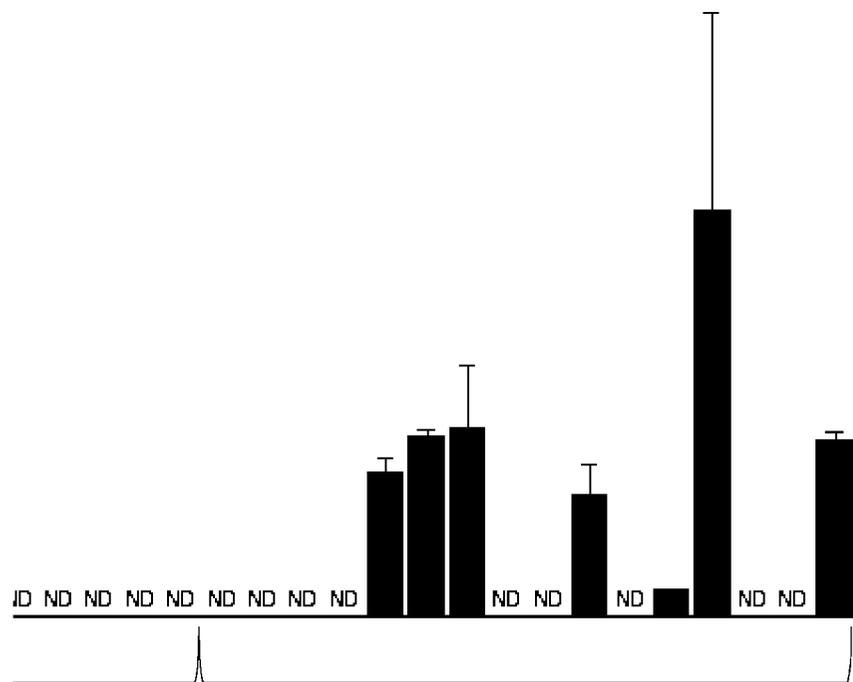
10. Активированный цитотоксический Т-лимфоцит (ЦТЛ), полученный способом *in vitro*, включающим контактирование ЦТЛ *in vitro* с нагруженными антигеном молекулами МНС человека I класса, экспрессированными на поверхности подходящей антигенпрезентирующей клетки, в течение периода времени, достаточного для активации антиген-специфическим образом ЦТЛ, где указанный антиген является пептидом, состоящим из SEQ ID NO: 303, или его фармацевтически приемлемой солью, для лечения и/или диагностики гепатоклеточной карциномы (ГКК).

Фигура 1А
Пептид: ALVDTLK FV (A*02)



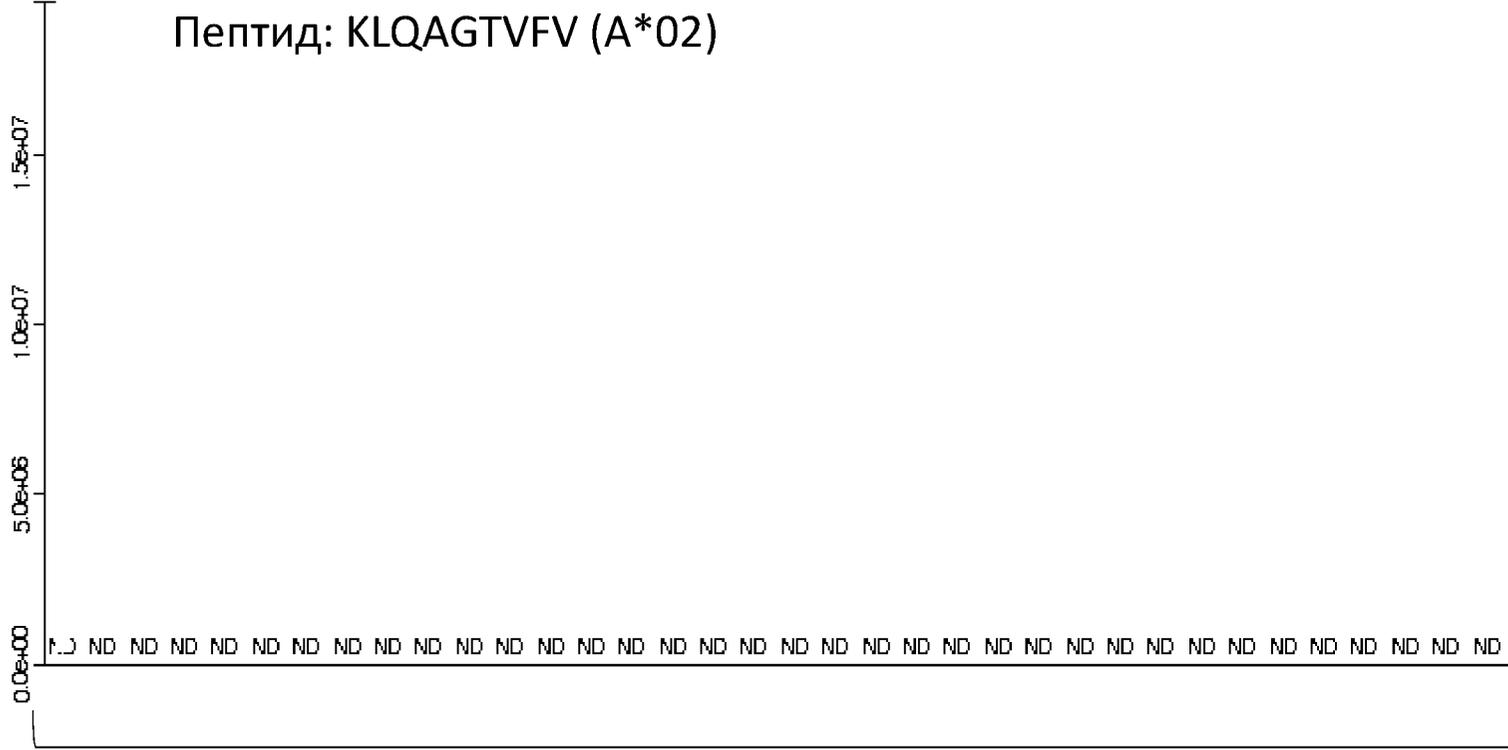
ФИГУРА 1А -
ПРОДОЛЖЕНИЕ

ЗАМЕНЯЮЩАЯ СТРАНИЦА



16 тканей ГКК

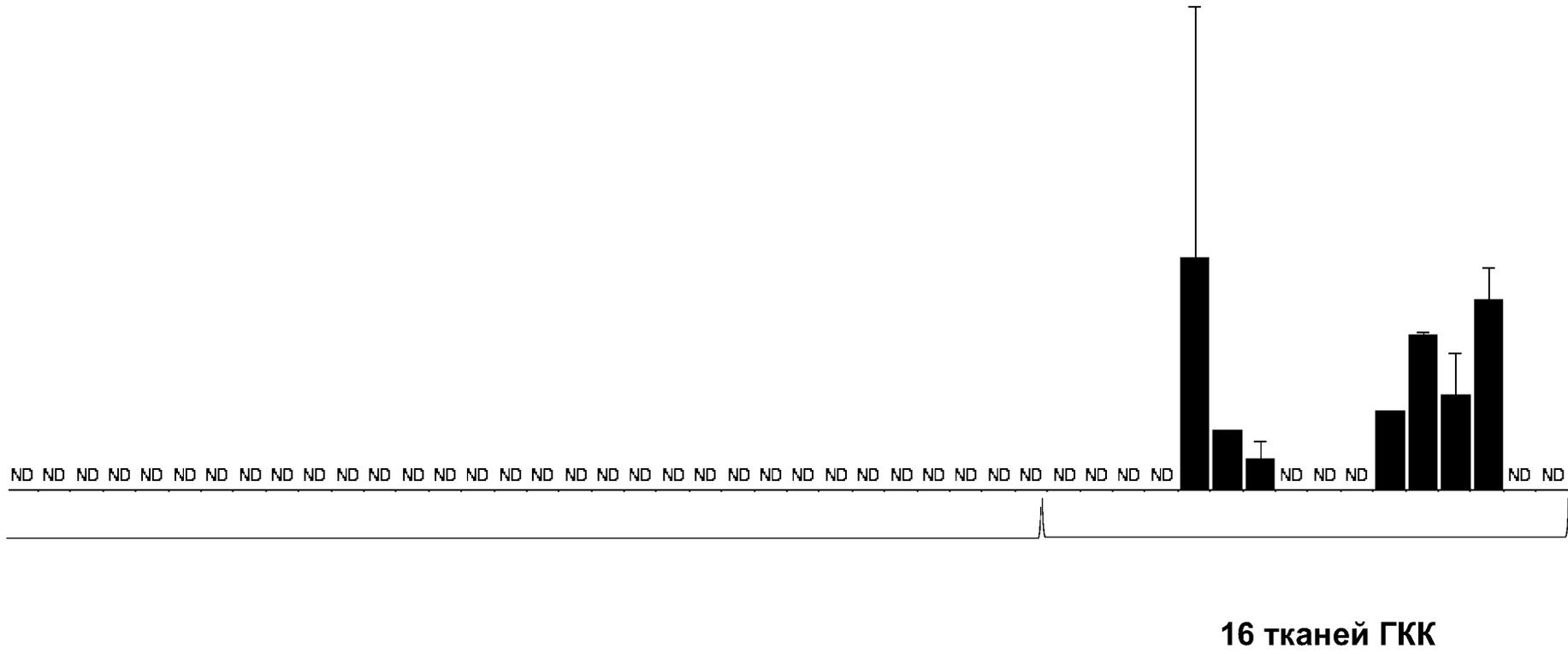
Относительная презентация [условные единицы]



177 нормальных тканей

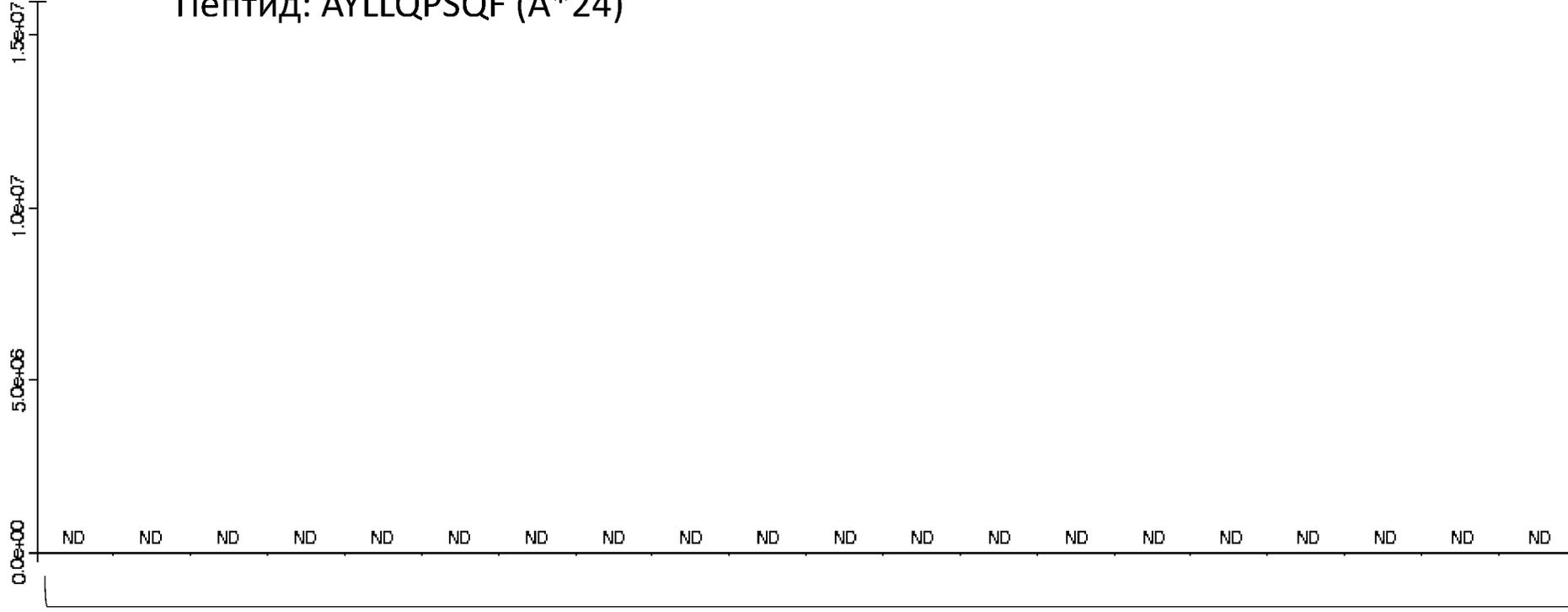
ФИГУРА 1В -
ПРОДОЛЖЕНИЕ

ЗАМЕНЯЮЩАЯ СТРАНИЦА



Относительная презентация [условные единицы]

Фигура 1С
Пептид: AYLLQPSQF (A*24)



69 нормальных тканей

ФИГУРА 1С -
ПРОДОЛЖЕНИЕ

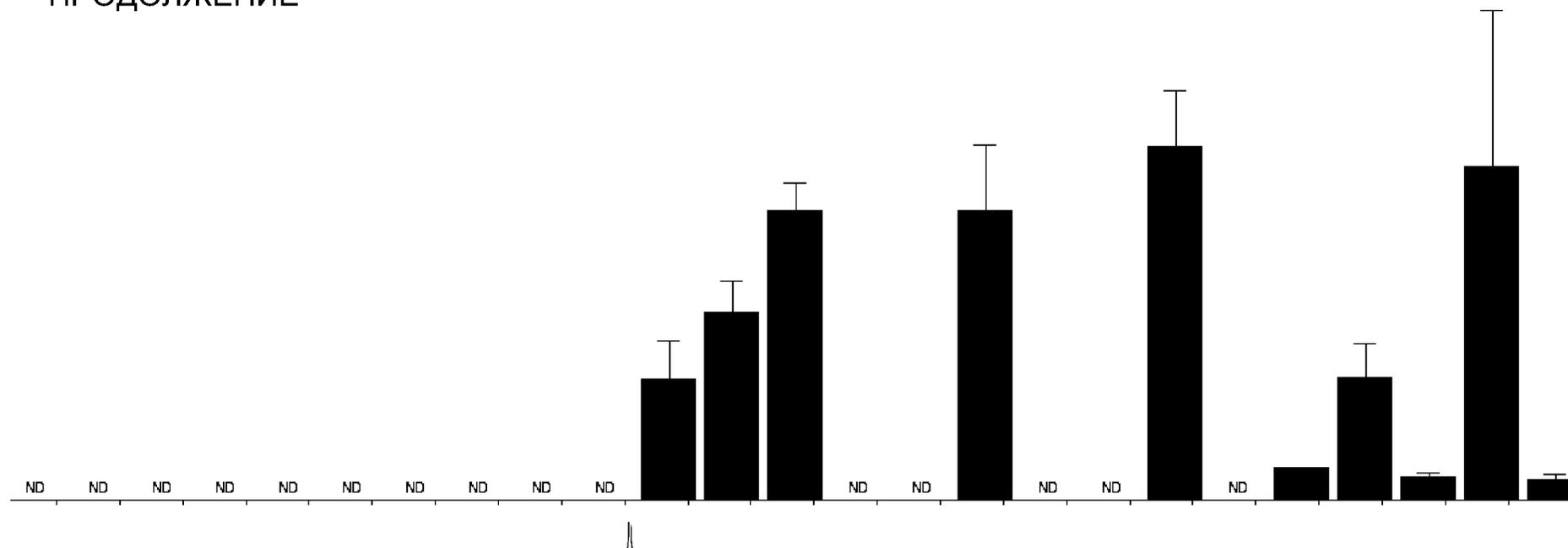
ЗАМЕНЯЮЩАЯ СТРАНИЦА

ND ND

ФИГУРА 1С -
ПРОДОЛЖЕНИЕ

ND ND

ФИГУРА 1С -
ПРОДОЛЖЕНИЕ



15 тканей ГКК

Фигура 1D

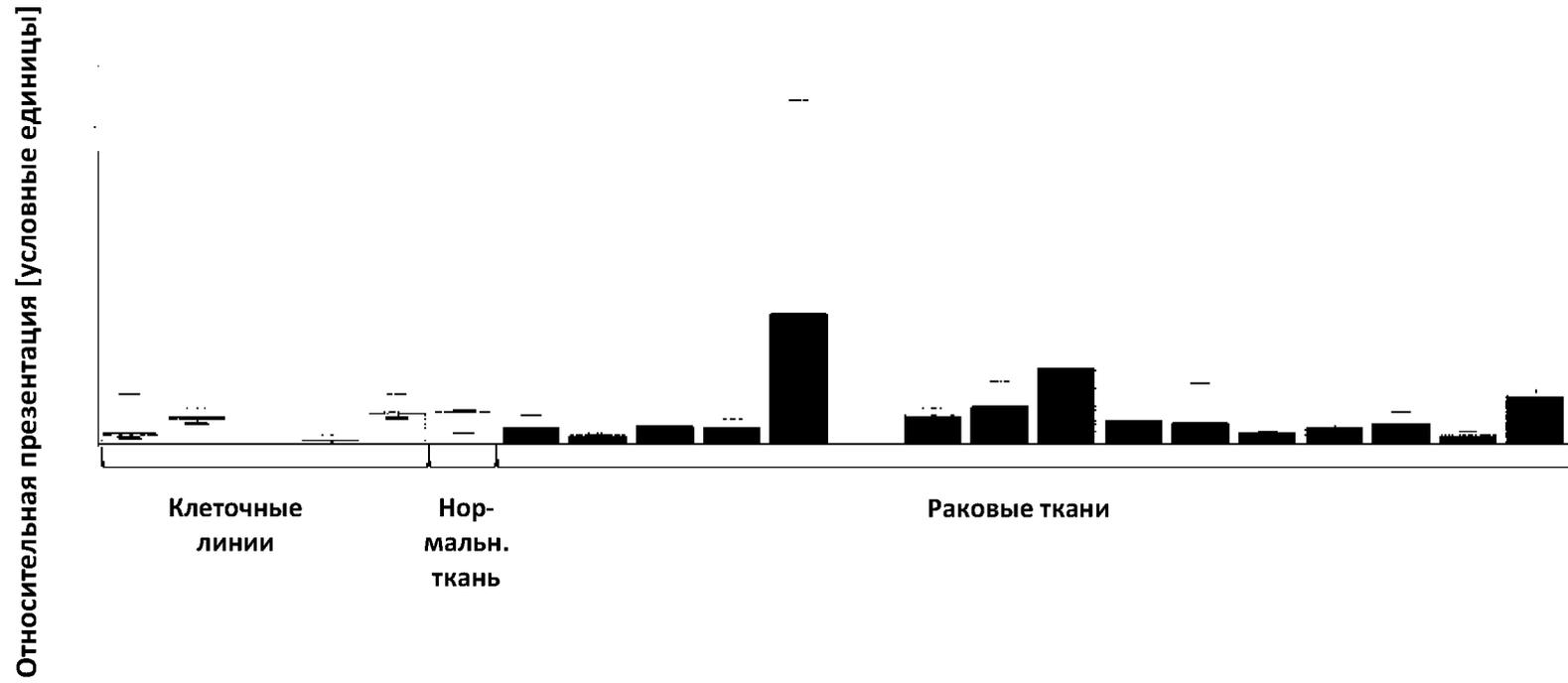
Пептид: KIDEKNFVV (A*02)

Seq ID: 63



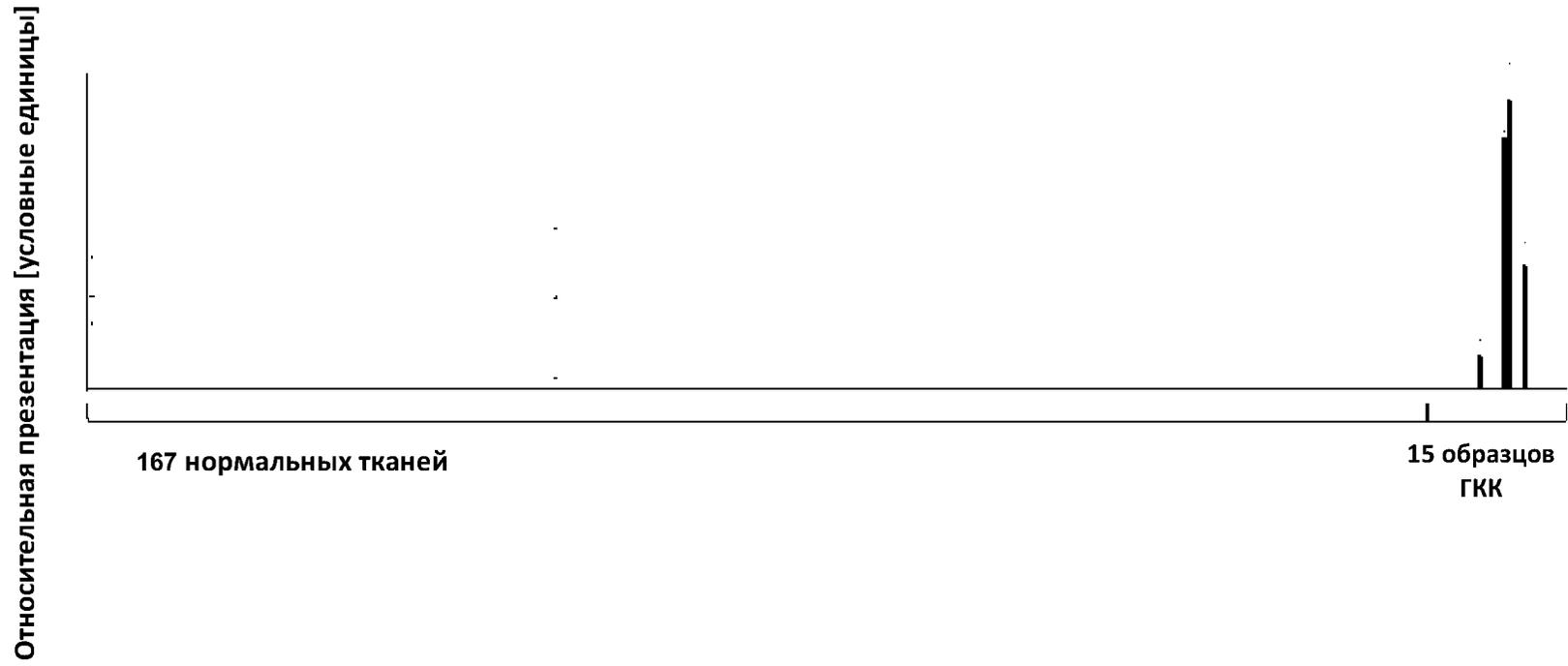
Фигура 1E

Пептид: KIDEKNFVV (A*02)
SEQ ID: 63



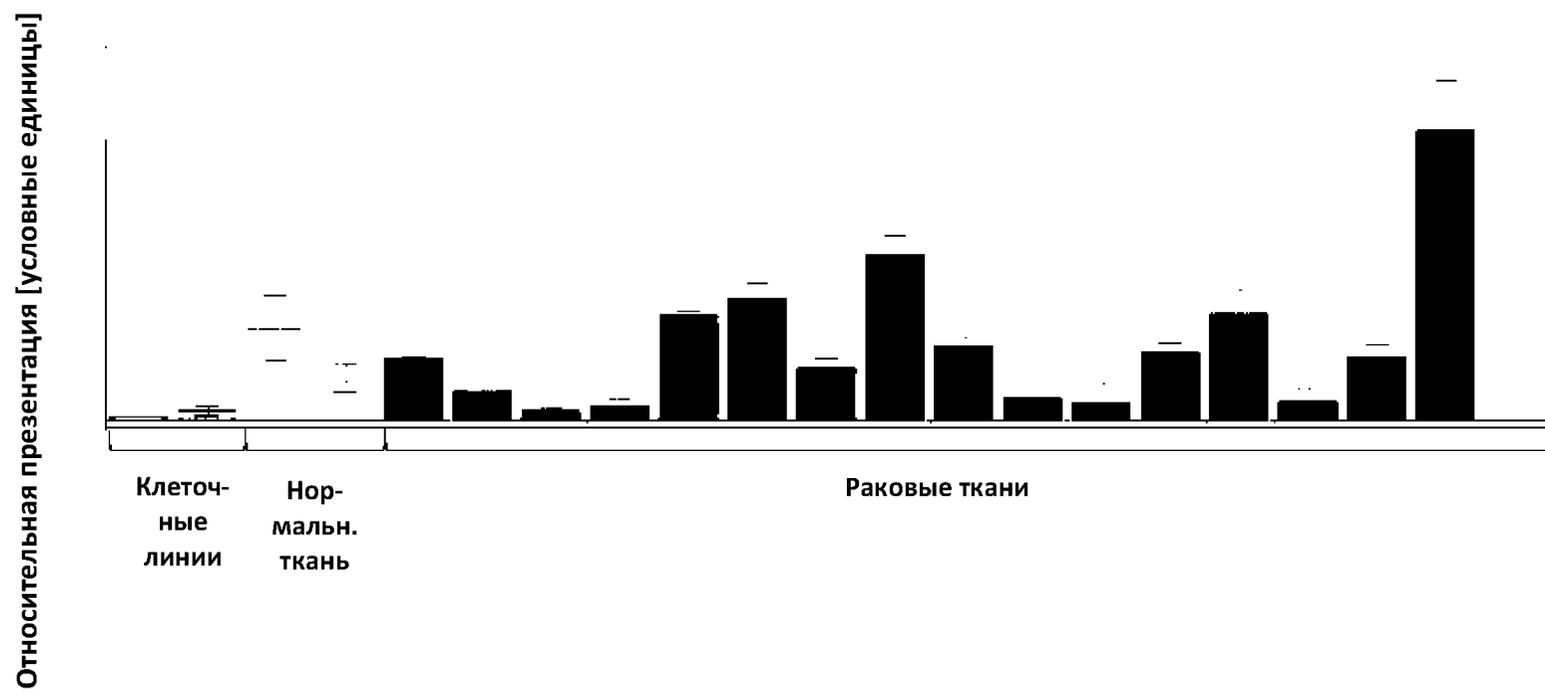
Фигура 1F

Пептид: RLPPDTLLQQV (A*02)
Seq ID: 92



Фигура 1G

Пептид: RLPPDTLLQQV (A*02)
SEQ ID: 92



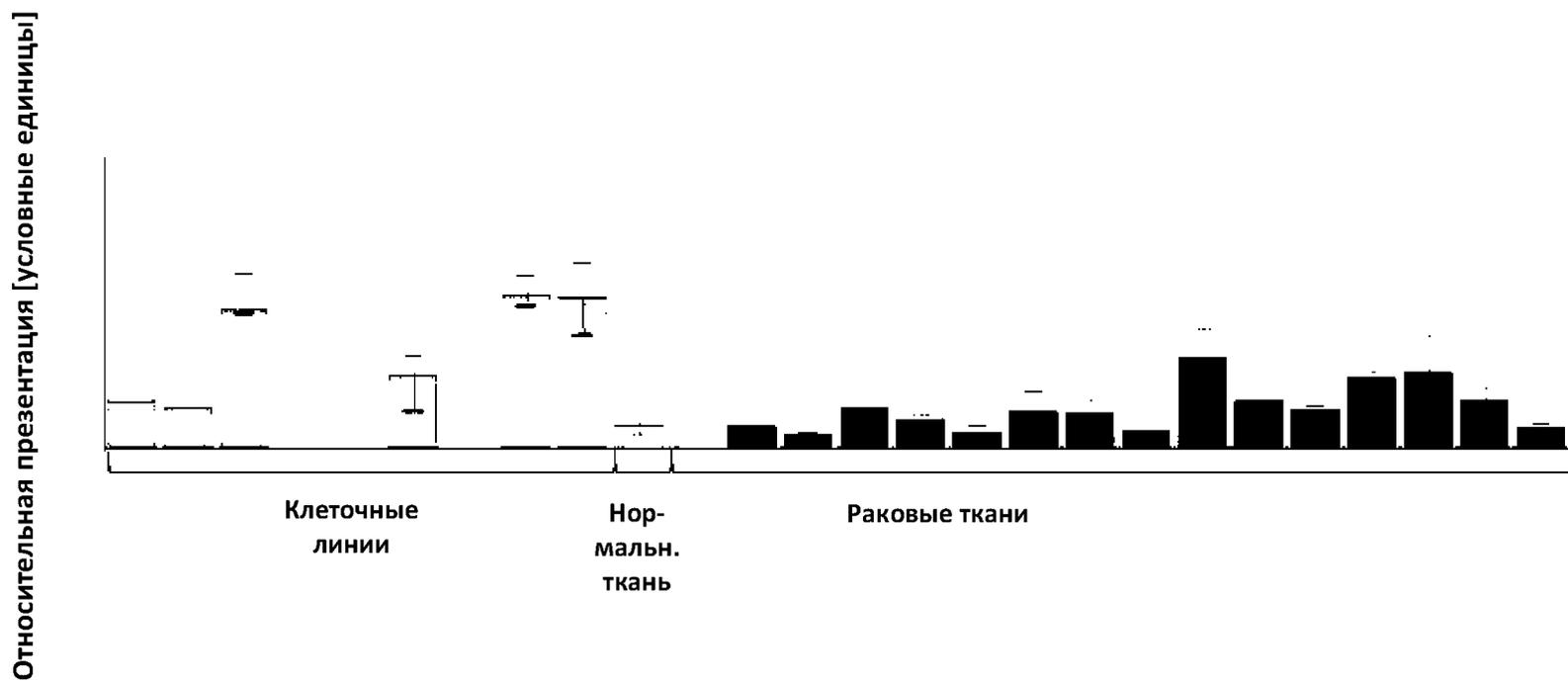
Фигура 1Н

Пептид: SVWFGPKEV (A*02)
Seq ID: 104



Фигура 1I

Пептид: SVWFGPKEV (A*02)
SEQ ID: 104



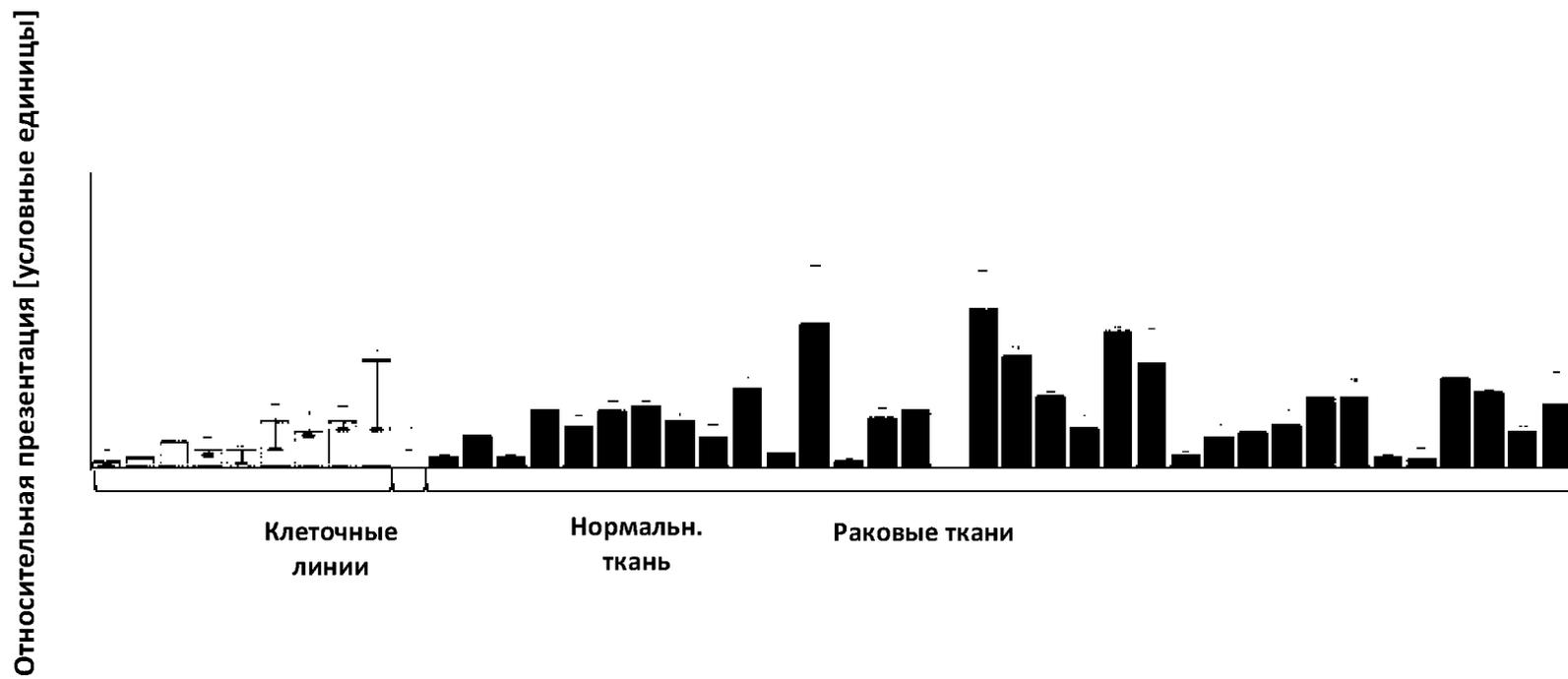
Фигура 11

Пептид: LLFPHPVNQV (A*02)
Seq ID: 156



Фигура 1К

Пептид: LLFPHPVNQV (A*02)
SEQ ID: 156



Фигура 1L

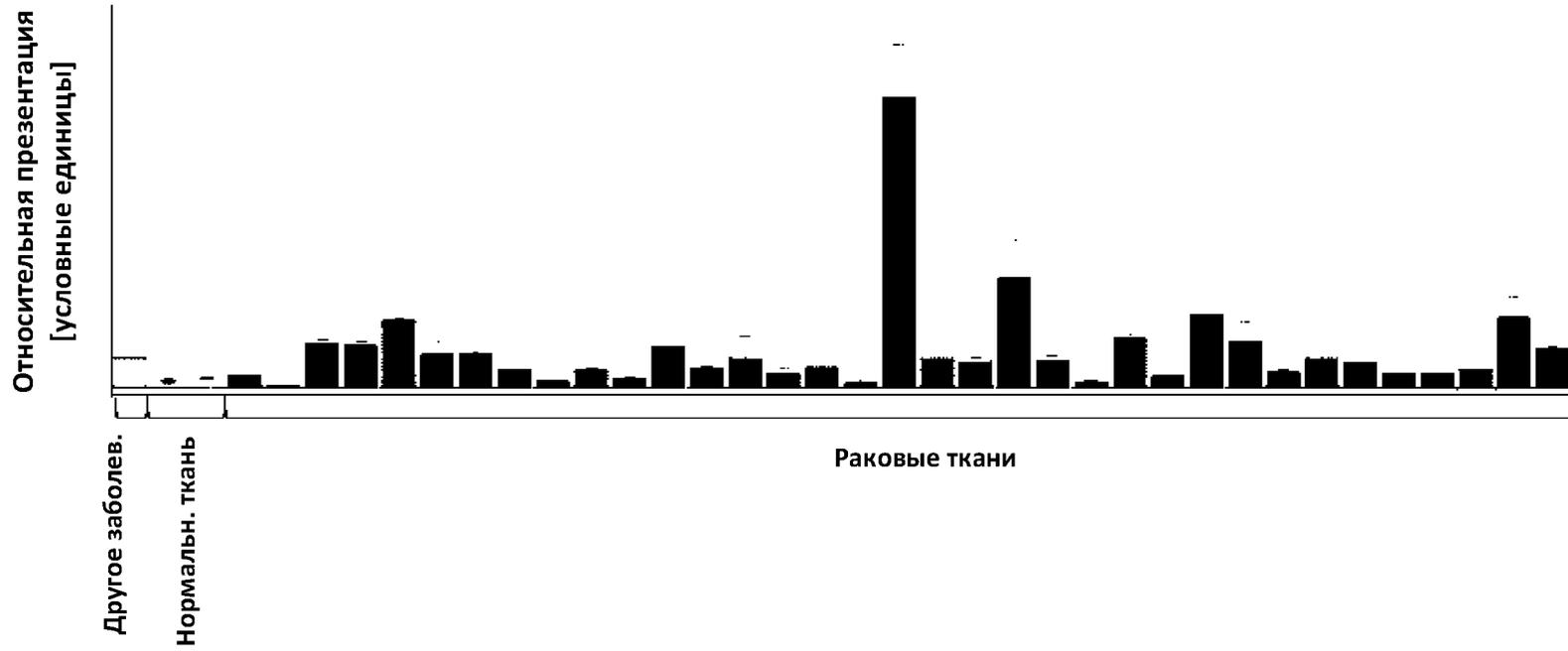
Пептид: FLDTRIAKV (A*02)

Seq ID: 47

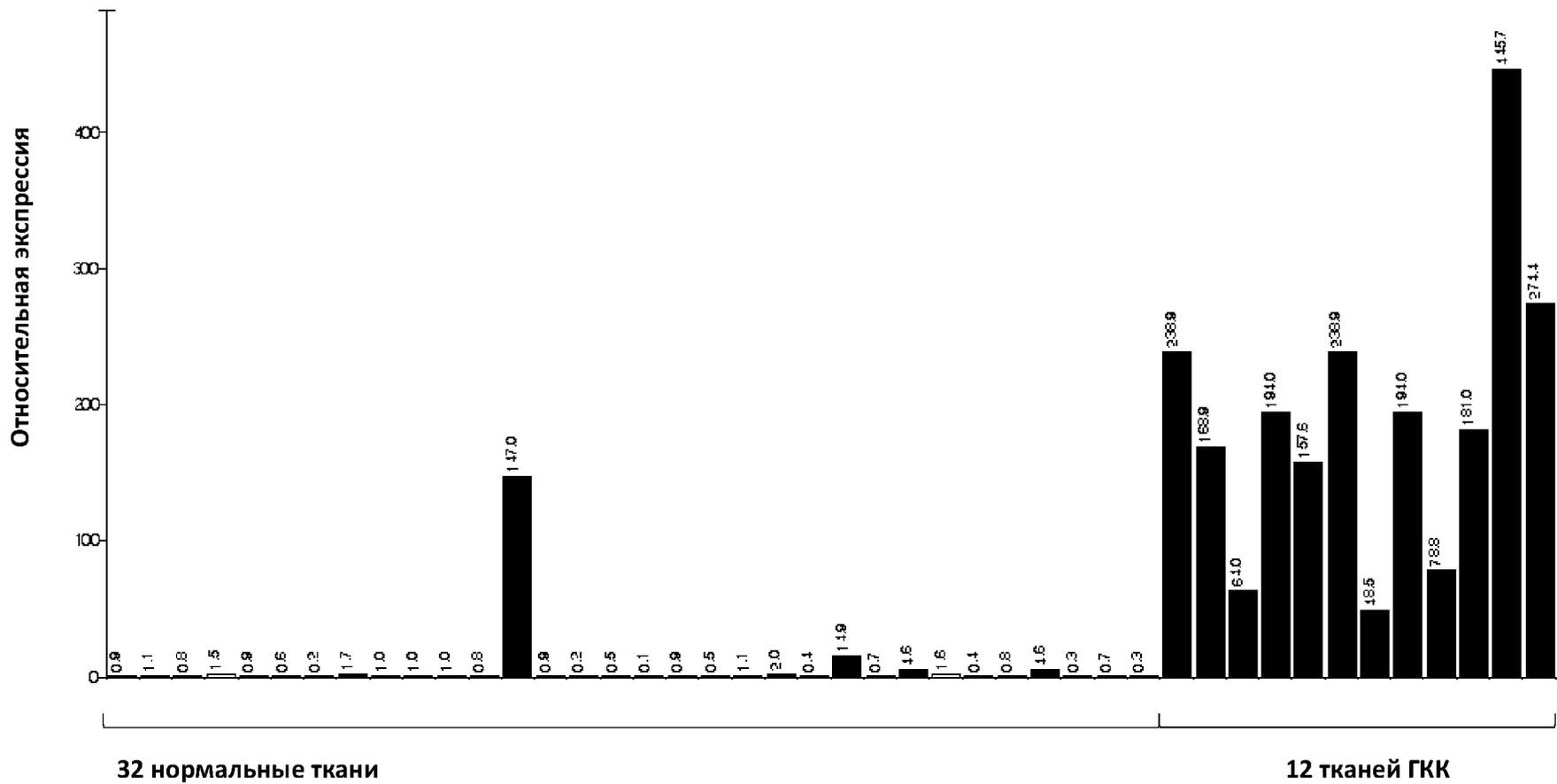


Фигура 1М

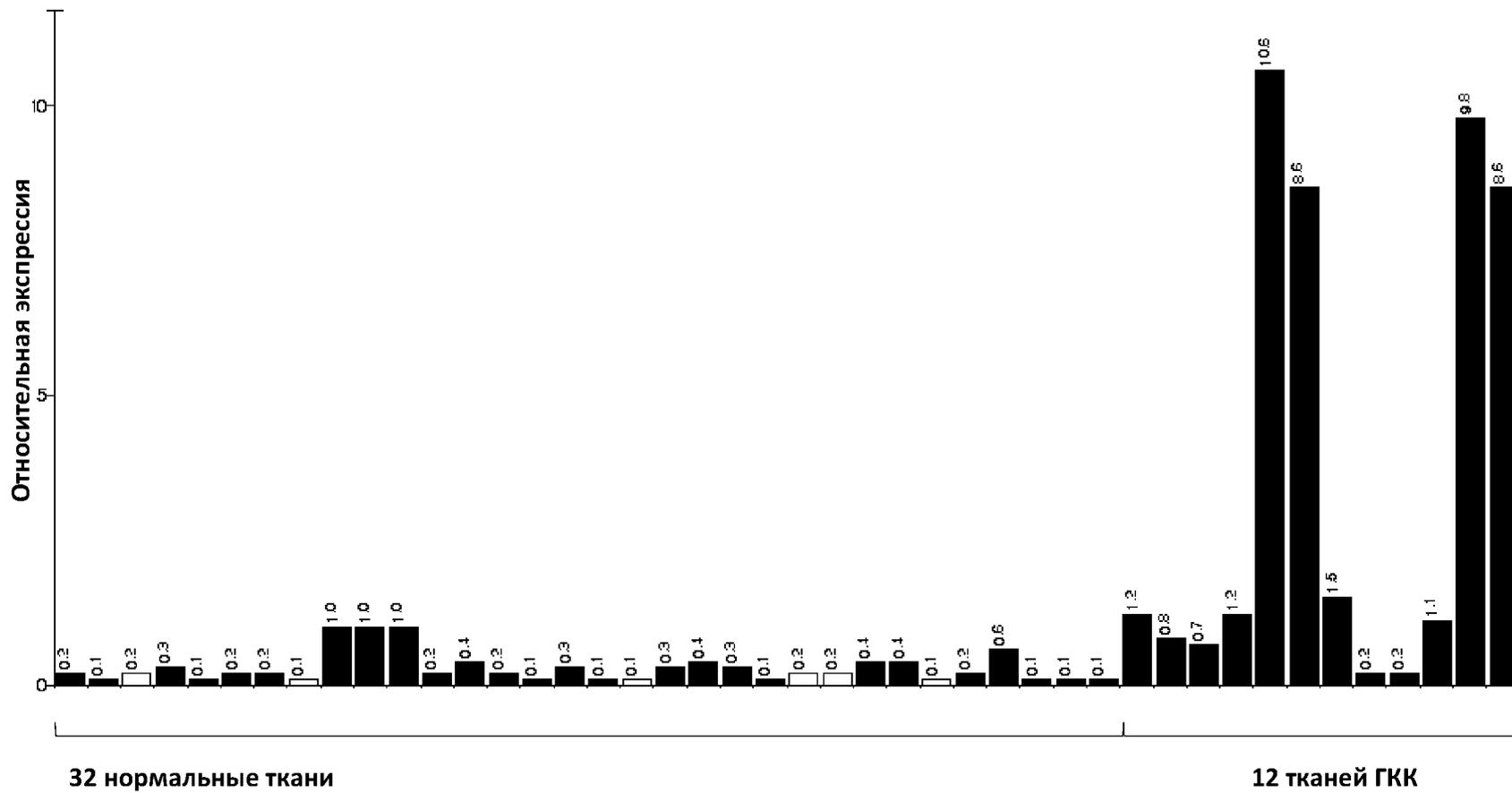
Пептид: FLDTPIAKV (A*02)
SEQ ID: 47



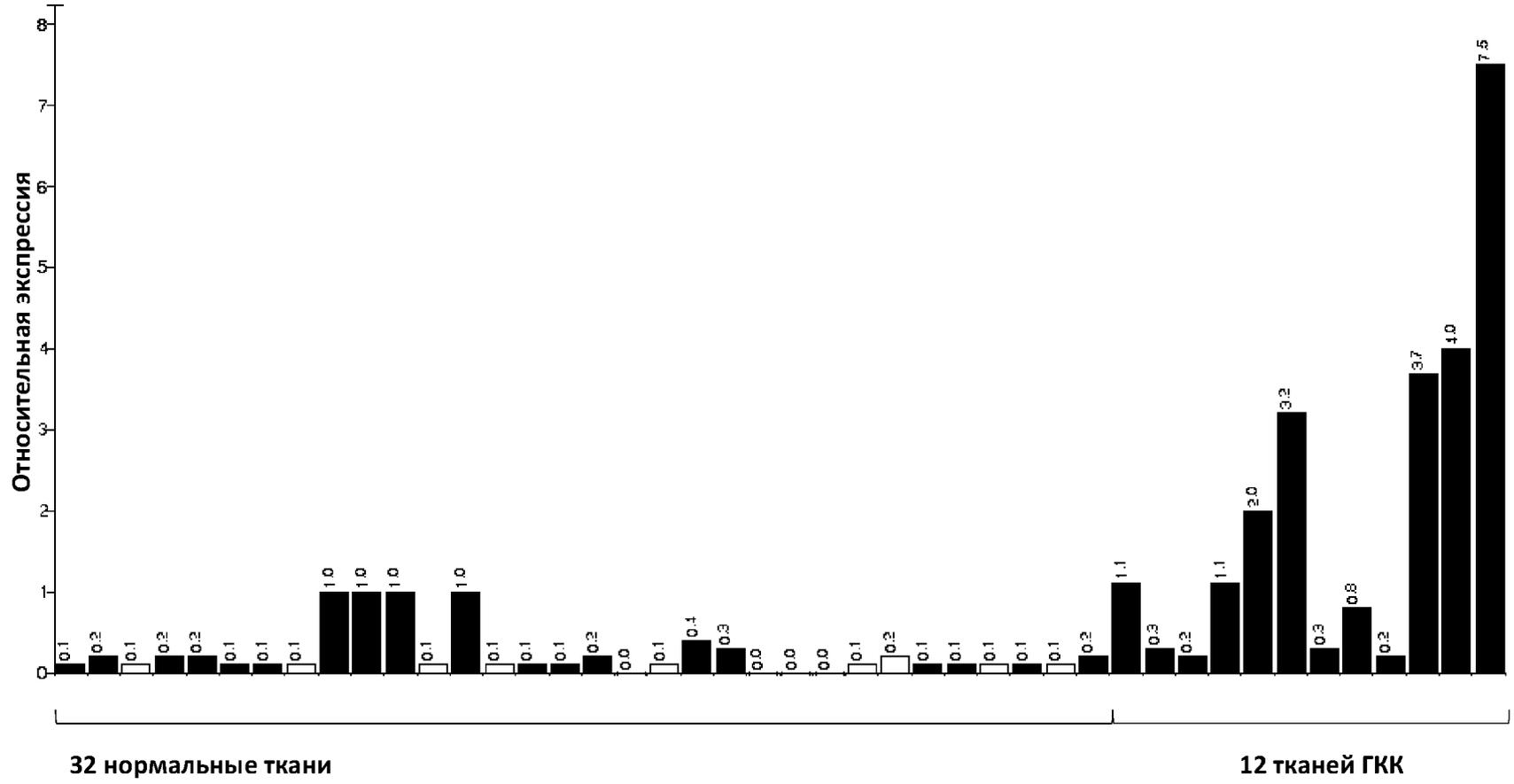
Фигура 2А



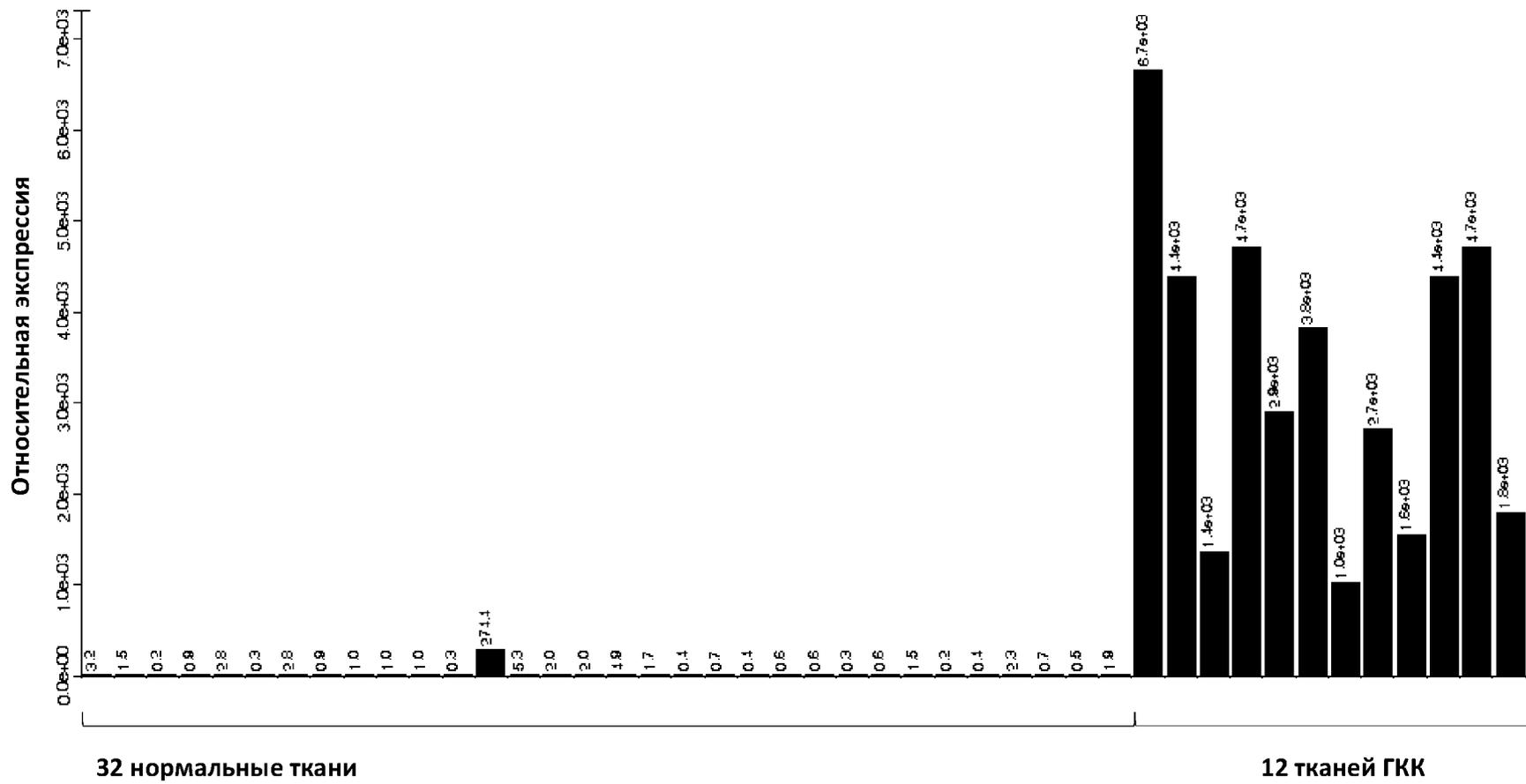
Фигура 2В



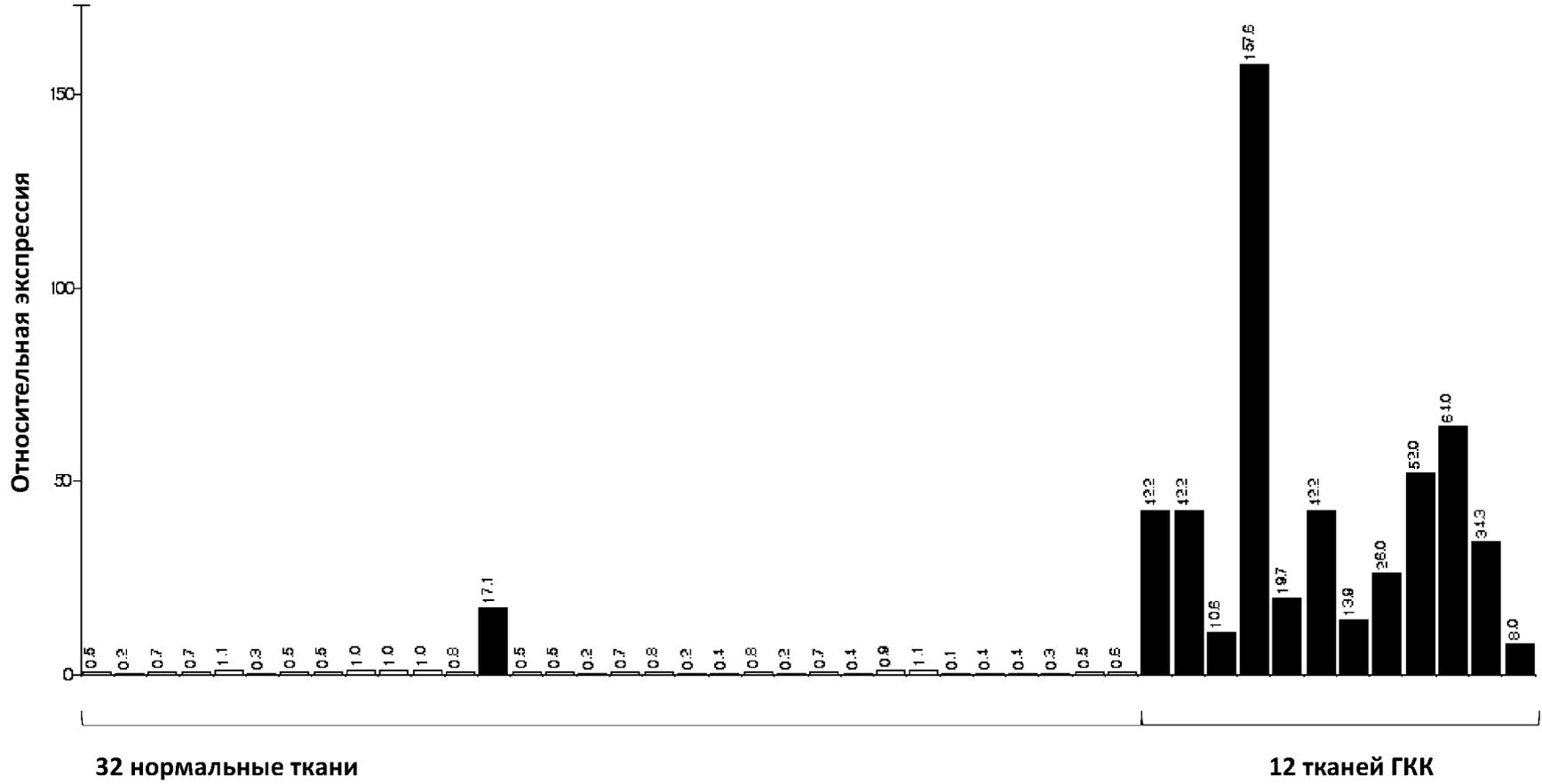
Фигура 2С



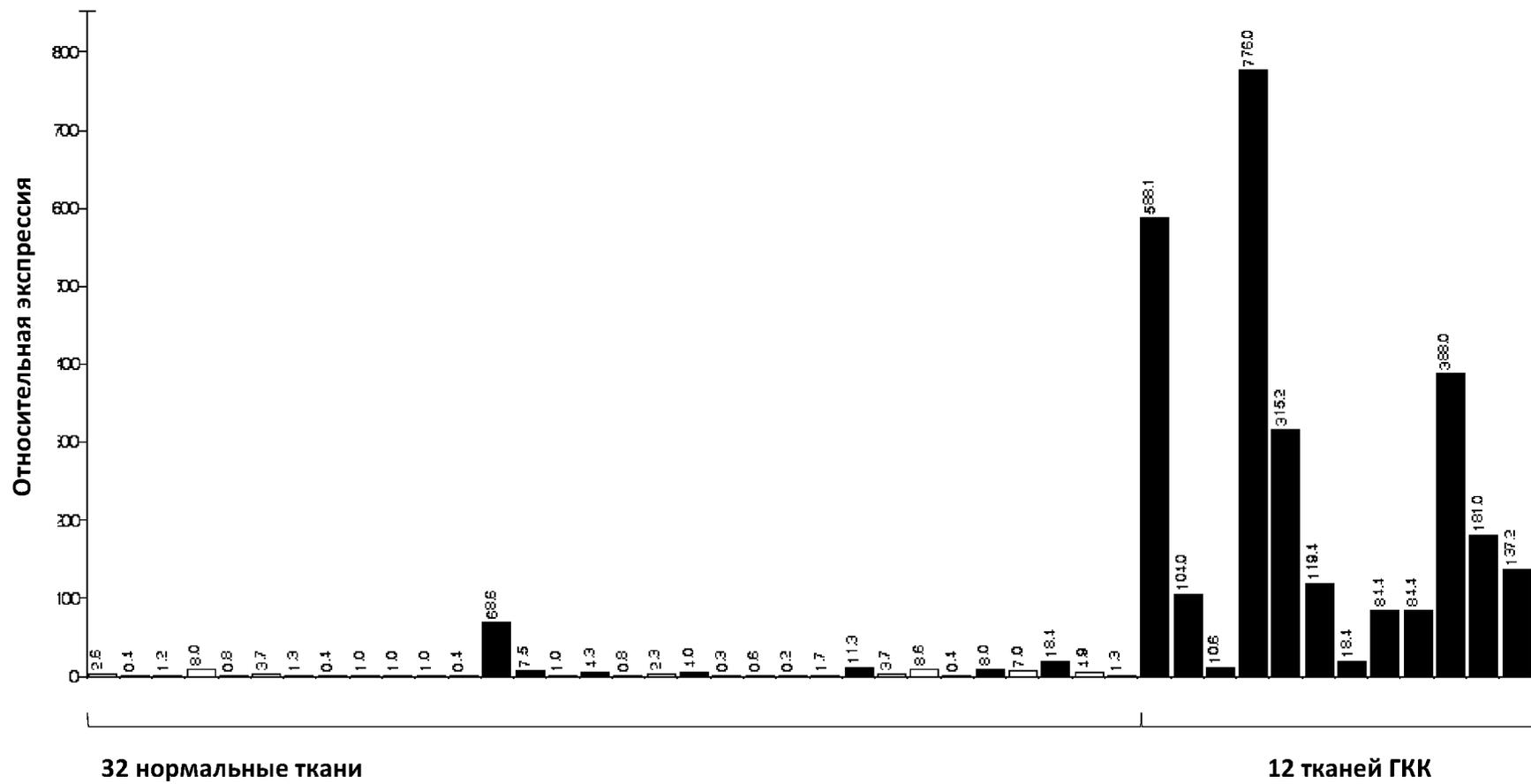
Фигура 2D



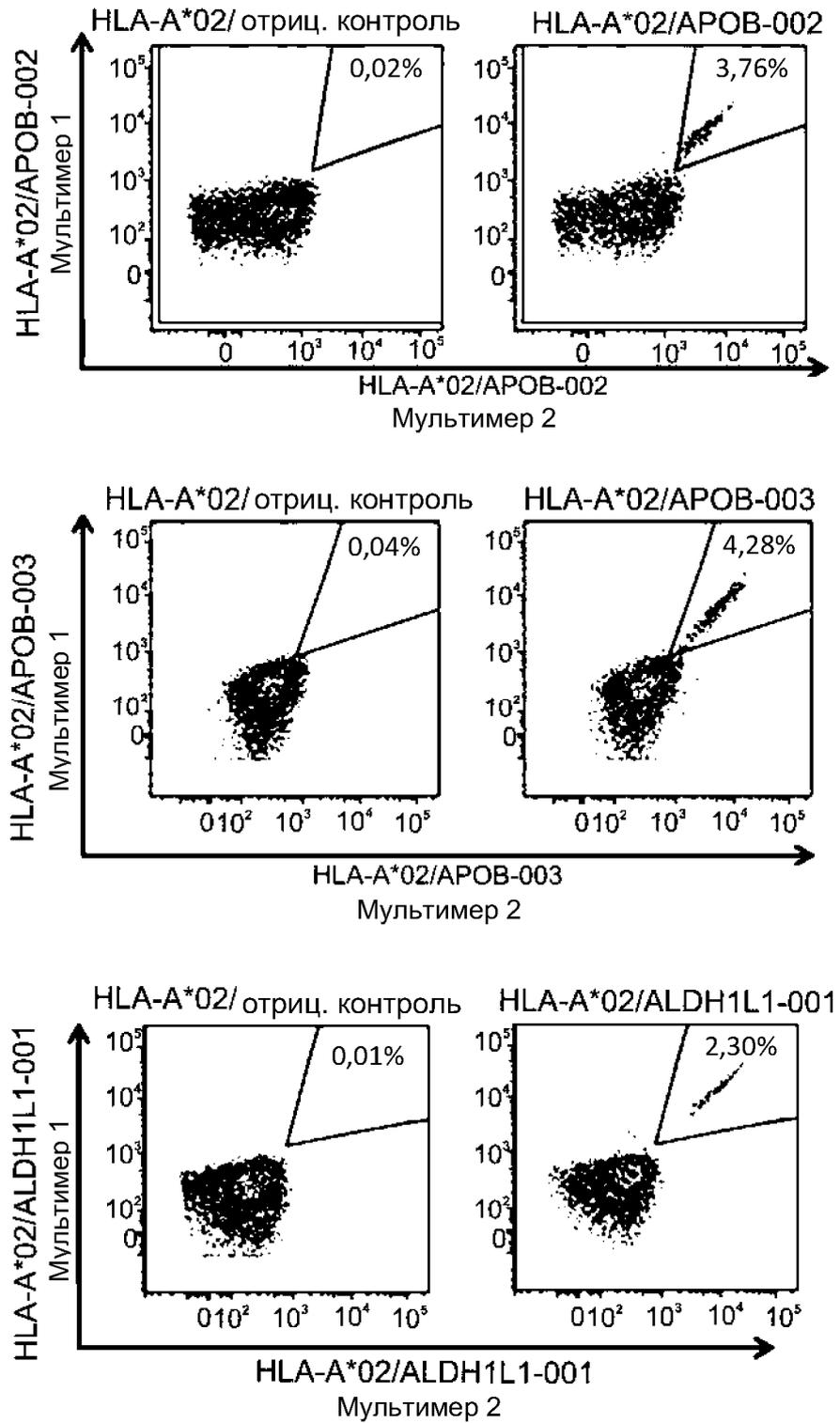
Фигура 2Е



Фигура 2F

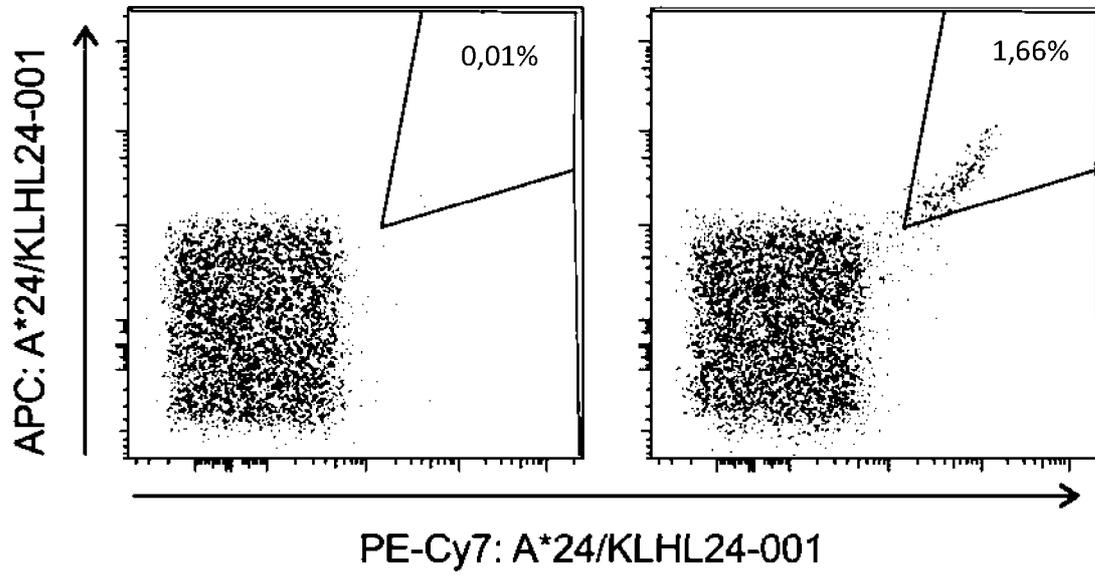


Фигура 3



Фигура 4

А



В

